

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



Avaliação da Integridade e da Actividade de Antígenos de
***Streptococcus equi* encapsulados em Lipossomas**

Lara Isabel Martins Figueiredo

MESTRADO EM BIOQUÍMICA

2010

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Avaliação da Integridade e da Actividade de Antígenos de
Streptococcus equi encapsulados em Lipossomas**

Lara Isabel Martins Figueiredo

MESTRADO EM BIOQUÍMICA

**Dissertação orientada pela Doutora Maria Luísa Corvo e pela Prof.
Doutora Helena Susana Pappámikail da Costa Marinho**

2010

ÍNDICE

Agradecimentos	vii
Resumo	ix
Abstract.....	xi
Índice de Figuras	xiii
Índice de Quadros	xv
Lista de Abreviaturas.....	xvii
1. Introdução.....	3
1.1 Gurma	3
1.1.1 Sintomas	4
1.1.2 Patogénese	5
1.1.3 Prevenção e Tratamento	8
1.2 Vacinas.....	11
1.2.1 A resposta imunitária.....	11
1.2.1.1 Imunidade das mucosas.....	13
1.2.2 Tipos de vacinas	14
1.2.3 Vias alternativas: as mucosas	15
1.2.4 Adjuvantes	16
1.2.4.1 Saís de alumínio:	19
1.2.4.2 ISCOMs e ISCOMATRIX.....	20
1.2.4.3 Adjuvante de Freund (Completo e incompleto).....	21
1.2.4.4 Monofosforil lípido A (MPLA).....	21
1.2.4.5 Toxina da cólera (CT) e enterotóxina termolábil de E. coli (LT)	22
1.2.4.6 Micro e Nanopartículas Poliméricas	22
1.2.4.7 Quitosano	23
1.3 Lipossomas	25
1.3.1 Lipossomas como adjuvantes	27
1.3.1.1 Internalização de lipossomas.....	29
1.3.1.2 Tipos de resposta imune	30
1.3.1.3 Lipossomas e a mucosa nasal.....	31
2. Materiais e Métodos	33

2.1	Materiais	35
2.2	Animais	35
2.3	Preparação de lipossomas	35
2.4	Caracterização dos lipossomas	37
2.4.1	Doseamento da proteína	37
2.4.2	Doseamento do lípido.....	37
2.4.3	Determinação do potencial zeta.....	38
2.4.4	Determinação do diâmetro médio.....	38
2.5	Estudo de perfil de eluição em coluna Sephadex G-200	38
2.6	Estudos de estabilidade	39
2.7	Estudo do perfil de libertação	39
2.8	Revestimento de lipossomas com quitosano	40
2.8.1	Quantificação do quitosano adsorvido aos lipossomas	40
2.9	Extracção de antígenos de <i>S. equi</i>	41
2.10	Estudo da integridade dos antígenos através de SDS-PAGE e <i>Western Blotting</i> 41	
2.11	Estudos de imunização.....	42
2.12	Recolha de amostras	42
2.13	Cultura de esplenócitos	43
2.14	Quantificação da resposta imune sistémica e mucosal	44
2.15	Análise estatística	44
3.	Resultados e Discussão	47
3.1	Optimização da formulação	49
3.1.1	Variações na eficiência de encapsulação usando BSA como proteína modelo 49	
3.1.2	Caracterização do extracto enzimático usado nos estudos preliminares de E.E. 55	
3.1.3	Extracto enzimático em solução aquosa.....	56
3.1.4	Método de Lowry: água vs tampão	58
3.1.5	Validação método do método do BCA modificado	59
3.1.6	Variação dos parâmetros de incorporação com a concentração de proteína inicial 60	
3.1.7	Método alternativo para separação da proteína não encapsulada.....	64
3.1.8	Estudos de estabilidade.....	70

3.1.8.1	Estabilidade à temperatura ambiente durante 24h.....	71
3.1.8.2	Estabilidade a 4°C durante 3 dias	73
3.1.9	Perfil de libertação.....	75
3.2	Lipossomas mucoadesivos.....	77
3.3	Experimentação animal.....	80
3.3.1	Preparação da vacina	80
3.3.2	Resposta imune.....	82
3.3.3	Resposta imune local	84
3.3.4	Produção de citocinas	86
4.	Conclusões	89
5.	Perspectivas Futuras.....	95
6.	Bibliografia.....	99

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não estaria devidamente concluído sem prestar os merecidos agradecimentos às pessoas que o tornaram possível. A todos deixo o meu mais sincero obrigado.

À Doutora Luísa Corvo agradeço a orientação, formação e os desafios colocados que contribuíram, não só para a minha aprendizagem, como também para o meu desenvolvimento pessoal.

Ao Professor Doutor António Almeida pela elaboração deste projecto e orientação. Um obrigado especial pela revisão da tese e por não ter desistido de mim.

À Doutora Lídia Gonçalves por me ter recebido tão calorosamente no seu laboratório. Obrigado pela orientação, ajuda e apoio sempre que precisei e sobretudo obrigado pela amizade.

A todos os amigos no INETI pela ajuda, simpatia e acolhimento que fizeram do laboratório um local ainda mais especial.

A todos os amigos na FFUL, obrigado pelos momentos de alegria no trabalho, descontração e apoio.

Aos meus amigos da FCUL por estarem ao meu lado não só neste último ano como também nos últimos seis! Obrigado por sermos uma família feliz. Um obrigado especial à Karina e à Ana pelo incentivo e apoio nos momentos em que mais precisei. À Diana por achar imensa piada às minhas histórias.

À Susana por ser a irmã mais velha que toda a gente sonha ter. Obrigado por tudo.

À Marisa por me fazer encarar o trabalho numa perspectiva diferente. Obrigado por todos os ensinamentos para a vida e sobretudo por nunca me deixar esmorecer.

À Goreti por me ouvir e ter sempre uma palavra amiga e de incentivo.

Por fim um obrigado especial aos meus pais, pelo sacrifício que fizeram e por sempre me permitirem e ajudarem a traçar o meu caminho.

RESUMO

Streptococcus equi subsp. *equi* é o agente infeccioso da gurma, doença que permanece como uma das mais dispendiosas e disseminadas por todo o mundo, afectando o tracto respiratório de equídeos. Embora *S. equi* apresente sensibilidade a alguns antibióticos, a prevenção continua a ser a melhor opção uma vez que este tipo de tratamento revela-se na maioria dos casos ineficaz.

Durante o período de recobro os animais desenvolvem uma resposta imune protectora principalmente contra a proteína M-“like” (SeM) antifagocítica associada à parede celular. No entanto, a vacinação de cavalos com bacterinas, extractos de *S. equi* com adjuvantes e mais recentemente, SeM associada a diferentes adjuvantes, não protege eficazmente os animais da infecção por *S. equi*.

Os antígenos produzidos localmente na nasofaringe desempenham um papel muito importante na resposta imune dos animais contra os antígenos de *S. equi*, fazendo da mucosa nasal uma via de imunização promissora.

Os lipossomas foram já descritos como potentes estimuladores da resposta imune das mucosas. O principal objectivo deste trabalho foi o desenvolvimento e caracterização de lipossomas estáveis encapsulando antígenos de *S. equi*, e avaliar o seu potencial como veículos de entrega de antígeno pela via nasal através das respostas imunes celular, humoral e das mucosas.

Os lipossomas encapsulando *S. equi* foram preparados pelo método de desidratação – reidratação seguido de extrusão e caracterizados quanto ao tamanho, carga superficial e eficácia de encapsulação. A manutenção da integridade dos antígenos após encapsulação foi confirmada por SDS-PAGE.

Os lipossomas assim preparados possuíam potencial zeta positivo, diâmetros médios na ordem dos 0,20 μm e eficiência de encapsulação de cerca de 28%. Após administração intranasal estes lipossomas provocaram resposta imune sistémica, com componente humoral e celular assim como resposta imune ao nível da mucosas das mucosas. Este sistema de veiculação de antígeno é apropriado para imunização nasal uma vez que protege o antígeno de degradação e o apresenta de forma eficaz às células apresentadoras de antígenos.

Como alternativa aos lipossomas carregados positivamente, lipossomas com carga superficial negativa foram revestidos com quitosano através de incubação. A influência do quitosano na carga superficial dos lipossomas foi também avaliada.

Palavras-chave: *Streptococcus equi* subsp. *equi*; SeM; lipossomas; resposta imune das mucosas; vacina.

ABSTRACT

Streptococcus equi subsp. *equi* (*S. equi*) is the causative agent of strangles, which is one of the most costly and widespread infectious diseases, affecting the respiratory tract of *Equidae*. Although *S. equi* is sensitive to some antibiotics, prevention is still the best option because antibiotic therapy is often ineffective.

During the recovery period, horses develop a protective immune response mostly against the antifagocytic cell wall associated M-like protein SeM. However, horse vaccination with bacterins, adjuvanted *S. equi* extracts and, more recently, SeM associated to different adjuvants, did not protect animals against infection with *S. equi*.

Locally produced nasopharyngeal antibodies play an important role in the immune response of horses to protein antigens of *S. equi*, suggesting the nasal mucosa as a promising immunization route.

Liposomes have been described as potent stimulators of mucosal immune response. The main purpose of the present work was to develop and characterize stable liposomes encapsulating *S. equi* antigens, and assess their potential as nasal vaccine delivery vehicle for eliciting specific humoral, mucosal and cellular immune responses.

S. equi antigens encapsulated liposomes were prepared by dehydration—rehydration method followed by extrusion and fully characterized for their size, surface charge and encapsulation efficiency. Antigen integrity after encapsulation was confirmed by SDS-PAGE.

The developed liposomes possessed +12mV zeta potential, an average vesicle size of 0,20 μm and encapsulation efficiency of ~28%. Following intranasal administration, *S. equi* extract formulated in liposomes elicited humoral, mucosal and cellular immune responses. This antigen delivery system presents itself as a potential carrier for nasal immunization protecting the antigen from degradation and efficiently presenting it to the antigen presenting cells.

As an alternative to positively charged liposomes, negatively charged liposomes were coated with chitosan by simple incubation method. The influence of mucoadhesive polymer chitosan on surface charge was also assessed.

Keywords: *Streptococcus equi* subsp. *equi*; SeM; liposomes; mucosal immune response; vaccine.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1.1.1 – Animais com sinais externos de gurma, à esquerda corrimento nasal mucopurulento, à direita edema dos gânglios linfáticos grave. (Adaptado de ⁹).	4
Figura 1.1.1.2 – Acumulação de drenagem mucopurulenta na cavidade gútural identificada através de endoscopia. (Adaptado de ⁴).....	4
Figura 1.1.1.3 – Animal com abscessos espalhados por todo o corpo (Adaptado de ⁹)	5
Figura 3.1.1.2 – Variação dos diâmetros médios dos lipossomas em função da concentração de proteína BSA. A – formulação A; B – formulação B; C – formulação C; D – formulação D. (média \pm S.D. ; n=3)	54
Figura 3.1.2.1 - Perfil electroforético do extracto enzimático antes e após diafiltração Poços: 1 – marcadores moleculares, 2 – Proteína SeM recombinante, 3 – Extracto enzimático, 4 – Extracto enzimático após diafiltração, 5 e 6 – Permeado da diafiltração	56
Figura 3.1.3.1 -Perfil de eluição do extracto enzimático livre em coluna PD10, equilibrada com água bidestilada.	57
Figura 3.1.6.1 - Análise por SDS-PAGE do extracto de <i>S. equi</i> após encapsulação em lipossomas. Faixas: 1 – marcadores moleculares; 2 – extracto de <i>S. equi</i> ; 3 - extracto de <i>S. equi</i> em MLVs; 4- Extracto de <i>S. equi</i> encapsulado em lipossomas.	63
Figura 3.1.7.1 - Perfil de eluição numa coluna de 10 cm de gel Sephadex G-200 equilibrada com tampão citratos pH=5,6. Aplicações de 300 μ l de cada amostra. P = proteína livre; LV = lipossomas vazios;.....	64
Figura 3.1.7.2 - Perfil de eluição numa coluna de 20 cm de gel Sephadex G-200 equilibrada com tampão citratos pH=5,6. Aplicações de 1ml de cada amostra. P = proteína livre; LV = lipossomas vazios;.....	65
Figura 3.1.7.3 - Perfil de eluição numa coluna de 10 cm de gel Sephadex G-200 equilibrada com tampão citratos pH=5,6. Aplicações de 300 μ l de cada amostra. P = proteína livre; LV = lipossomas vazios;.....	66
Figura 3.1.7.4 - Perfil de eluição numa coluna de 20 cm de gel Sephadex G-200 equilibrada com tampão citratos pH=5,6. Aplicações de 1ml de cada amostra. P = proteína livre; LV = lipossomas vazios;.....	66
Figura 3.1.7.6 - Perfil de eluição numa coluna de 10 cm de gel Sephadex G-200 equilibrada com tampão fosfatos. Aplicações de 300 μ l de cada amostra. P = proteína livre; LV = lipossomas vazios	68
Figura 3.1.7.5 - Perfil de eluição da proteína a 280 nm, com e sem DTT	69
Figura 3.1.8.1 – Variação da razão proteína/lípido ao longo de 24h de lipossomas positivos encapsulando antígenos totais de <i>S. equi</i> , à temperatura ambiente.	71
Figura 3.1.8.2 – Variação do diâmetro médio e PDI de lipossomas encapsulando <i>S. equi</i> ao longo de 24h, à temperatura ambiente.	71
Figura 3.1.8.3 – Gel SDS-PAGE da evolução de lipossomas encapsulando antígenos totais ao longo de 24h. 1- marcadores moleculares; 2 ,3 – MLVs; 4, 5 – DRVVs; 6 – t=0; 7 - t=2,5h; 8 – t=5h; 9 – t=24h.....	72

Figura 3.1.8.4 – Variação da razão proteína/lípido ao longo de 72h de lipossomas positivos encapsulando antígenos totais de <i>S. equi</i> , a 4°C.	73
Figura 3.1.8.5 - Variação do diâmetro médio e PDI de lipossomas encapsulando <i>S. equi</i> ao longo de 72h, a 4°C.....	73
Figura 3.1.8.6 - Gel SDS-PAGE da evolução de lipossomas encapsulando antígenos totais ao longo de 72h. 1- marcadores moleculares; 2 – MLVs; 3 – DRVs; 4 – t=0; 5 – t=1h; 6 – t=18h; 7 – t=24h; 8 – t= 48h; 9 – t=72h.....	74
Figura 3.1.9.1 – Perfil de libertação da proteína <i>in vitro</i> da formulação lipossomal	75
Figura 3.1.9.2 - Variação dos diâmetros médios de lipossomas contendo extracto de <i>S. equi</i> ao longo de 6 semanas <i>in vitro</i>	76
Figura 3.1.9.1 – Potências zeta de lipossomas negativos após incubação com quitosano	78
Figura 3.3.1.1 – Análise por SDS-PAGE (1 e 2) e Western Blot (3 e 4) do extracto enzimático a utilizar na vacinação. 1 e 3 – marcadores moleculares 2 e 5 – extracto enzimático.....	81
Figura 3.3.2.1 – Anticorpos específicos IgG, IgG1 e IgG2a em soros de animais imunizados pela via i.n. com lipossomas encapsulando extracto enzimático de <i>S. equi</i> . (n=5; média ± SEM)	83
Figura 3.3.2.2 – Relação IgG2a/IgG1.(n=5; média ± SEM)	84
Figura 3.3.3.1 – Níveis de IgA específicos provocados pela imunização com lipossomas contendo extracto enzimático, lipossomas vazios e PBS. As diferenças não são significativas entre lipossomas vazios e lipossomas contendo extracto enzimático. Ambos são significativamente diferentes do PBS. (P-value<0,05) (n=5; média ± SEM)	85
Figura 3.3.4.1 – Níveis de IL-6, INF- γ , IL-4 e IL-2 induzidos após estimulação dos esplenócitos com extracto enzimático de <i>S. equi</i>	87

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1.2.4.1 – Resumo de adjuvantes aprovados para uso humano e adjuvantes estudados na associação com antígenos de <i>S. equi</i> . ^{4,17,26,37,39}	19
Quadro 3.1.1.1 – Diferentes razões molares e composições lipídicas estudadas.....	50
Quadro 3.1.3.1 – Cálculo do rendimento da coluna PD-10 na eluição do extracto enzimático.....	58
Quadro 3.1.4.1 – Comparação entre água e tampão citratos na quantificação de proteína pelo método de Lowry	59
Quadro 3.1.5.1 – Comparação entre métodos de quantificação de proteína.....	59
Quadro 3.1.6.1 – Quadro resumo da variação da eficácia de encapsulação em função da variação da concentração inicial de proteína	60
Quadro 3.1.6.2 – Estudo do efeito da natureza proteica nos parâmetros de encapsulação	61
Quadro 3.1.6.3 – Evolução de diferenças entre diâmetros médios, PDI e potenciais zeta para diferentes concentrações de extracto enzimático. (n.d. = não determinado)	62
Quadro 3.1.6.4 – Cálculos das E.E. após passo de concentração através de centrifugação	62
Quadro 3.1.9.1 – Quantidades de quitosano presentes no sobrenadante após incubação de lipossomas negativos com quitosano de baixa (BMM), média (MMM) e elevada (EMM) massa molecular	77
Quadro 3.3.1.1 – Caracterização física e química da formulação usada no processo de imunização.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Células apresentadoras de antígeno
BALT	Tecido linfóide associado aos brônquios
BCA	Ácido bicinchonínico
BCIP	5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil-1- Fosfato
BMM	Baixa massa molecular
BSA	Albumina bovina sérica
Chol	Colesterol
CMIS	Sistema imune comum das mucosas
CT	Toxina da cólera
CTL	Linfócitos T citotóxicos
DTT	Ditiotreitol
E.E.	Eficiência de encapsulação
ELISA	Enzima Imunoensaio
EMM	Elevada massa molecular
Fb	Fibrinogénio
Fb-BP	Proteína de ligação ao fibrinogénio
Fn	Fibronectina
GALT	Tecido linfóide associado aos intestinos
i.n.	Intransal
IFN- γ	Interferão gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
ISCOMS	Complexos imunoestimuladores
LPS	Lipopolissacárido
LT	Enterotóxina termolábil
LUV	Lipossomas unilamelares grandes
MALT	Tecido linfóide associado às mucosas
MHC	Complexo de histocompatibilidade
MLV	Lipossomas multilamelares
MMM	Média massa molecular
MPLA	Monofosforil lípido A

n.d.	Não determinado
NALT	Tecido linfóide associado à nasofaringe
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Tampão de fosfatos salino
PCL	Poli-ε-caprolactona
PEG	Polietileno glicol
PG	Fosfatidilglicerol
PLGA	Poli (ácido láctico)
PMSF	Fluoreto de fenil-metil-sulfonilo
PRR	Receptores de reconhecimento de padrões
PS	Fosfatidilserina
SA	Esterilamina
SDS-PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida e dodecilsulfato de sódio
SeM	Proteína M
sIgA	Imunoglobulina A secretória
SMF	Sistema mononuclear fagocítico
SOD	Superóxido dismutase
SUV	Lipossomas unilamelares pequenos
TNF-β	Factor necrosante tumoral

1. INTRODUÇÃO

1.1 Gurma

A gurma é uma doença infecciosa que afecta os equídeos, altamente contagiosa e que permanece endémica em vários países, representando 30% das doenças infecciosas reportadas ao *International Collating Center*.¹ Os primeiros registos conhecidos sobre a doença datam do século XIII, tendo sido descrita por Giordano Ruffo e Albertus Magnus nos manuscritos *De Medicina Equorum* e *De Animalibus* respectivamente.²

Esta doença tem uma grande importância a nível económico pois uma vez diagnosticada, implica o isolamento dos animais infectados de modo a prevenir o contágio.^{3,4}

O *Streptococcus equi* subsp. *equi* (*S. equi*) é o agente infeccioso desta doença, membro do grupo C da classificação de Lancefield e foi identificado no século XIX por Sand, Jenson e Schutz.^{2,4} Recentemente, e devido à descoberta de uma relação fenotípica e genética com *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (*S. zooepidemicus*), *S. equi* foi identificada como sua descendente evolutiva.⁵

A infecção ocorre após ingestão ou inalação de partículas do ambiente contaminadas com *S. equi*. Assim que as bactérias transpõem as mucosas oral e nasofaríngea colonizam nos gânglios linfáticos da faringe e tracto respiratório superior dos equídeos, particularmente a nasofaringe. Esta infecção é caracterizada por corrimento nasal mucopurulento, edema agudo dos gânglios linfáticos com consequente formação de abcessos e febre elevada. O desconforto causado pelos abcessos e faringite conduz os animais à inapetência, podendo levá-los à anorexia e depressão.^{6,7} A gurma é uma doença altamente contagiosa uma vez que ocorre tanto por contacto directo com o pus ou corrimento nasal de cavalos infectados ou por via indirecta através de alimentos, água ou equipamento contaminados.

Permanece uma doença temida por todo o mundo devido aos seus efeitos debilitantes tanto nos animais como a nível económico.^{4,8}

1.1.1 Sintomas

A gravidade dos sintomas pode variar dependendo da idade e desenvolvimento imunitário dos animais, sendo os animais mais jovens os mais afectados e susceptíveis à doença. Os sintomas iniciais apresentam-se 3 a 14 dias após a infecção e incluem um aumento súbito da temperatura, inapetência, corrimento nasal e desenvolvimento de edema nos gânglios linfáticos. O desenvolvimento de abscessos nos gânglios submandibulares e retrofaríngeos pode conduzir à obstrução das vias nasais, tosse e dificuldade em engolir.^{4,7}



Figura 1.1.1.1 – Animais com sinais externos de gurma, à esquerda corrimento nasal mucopurulento, à direita edema dos gânglios linfáticos grave. (Adaptado de ⁹).

Após maturação ocorre a eclosão dos abscessos e drenagem do líquido mucopurulento contendo concentrações elevadas de bactérias, que podem contagiar animais saudáveis em contacto directo. A irrupção pode ocorrer internamente, drenando para o exterior através das vias nasais, ou directamente para o exterior através de uma abertura na pele que pode ser confundida com uma ferida. Após a drenagem os abscessos tendem a atrofiar e a cicatrizar rapidamente, seguindo-se na maioria dos casos uma recuperação total e eliminação completa de *S. equi*.^{4,8}



Em alguns casos ocorre drenagem dos gânglios linfáticos da retrofaringe para a região da garganta, permitindo que a *S. equi* se aloje nas bolsas guturais do cavalo, que desta forma

Figura 1.1.1.2 – Acumulação de drenagem mucopurulenta na cavidade gutural identificada através de endoscopia. (Adaptado de ⁴)

não evidencia sinais da doença e aparenta uma cura total da doença. As bolsas guturais são dois compartimentos isolados localizados na região da garganta, exclusivas da espécie equina, que comunicam com a faringe através de um pequeno orifício. A abertura intermitente deste orifício permite a libertação das bactérias, alojadas nas bolsas guturais, para a garganta e de seguida para o meio ambiente através da respiração. Esta condição afecta cerca de 10% dos animais infectados, que por sua vez podem acomodar a bactéria durante meses, constituindo um elevado risco de contaminação e perpetuação da doença.

Por outro lado, apesar da maioria dos casos serem benignos, em cerca de 5% dos animais infectados as bactérias alastram-se através da circulação sistémica, ocorrendo formação de abscessos noutras regiões do corpo que não a garganta, como por exemplo o abdómen, tórax ou articulações. A ruptura destes abscessos, com consequente libertação de material purulento dentro do corpo do animal, pode levar a uma reacção inflamatória tão severa que na maioria dos casos conduz à morte do animal.^{2,4,7}



Figura 1.1.1.3 – Animal com abscessos espalhados por todo o corpo (Adaptado de ⁹)

1.1.2 Patogénese

Embora esta doença detenha o estatuto de doença endémica, o mecanismo de patogénese de *S. equi* ainda não se encontra totalmente esclarecida. A infecção ocorre após inalação ou ingestão do organismo e pode-se dividir em 3 fases principais:

Fase I – Adesão de *S. equi* à mucosa do tracto respiratório superior;

Fase II – Invasão do epitélio respiratório pelo *S. equi*;

Fase III – Resistência do microrganismo à fagocitose pelas células do sistema imunitário.

Fase I – Adesão de *S. equi* à mucosa do tracto respiratório superior

A adesão permite ao organismo interagir com substrato, aumentando as suas possibilidades de sobrevivência até que se ligue de modo específico e irreversível em

local que favoreça a colonização e o crescimento. Neste processo estão envolvidas várias adesinas bacterianas que se ligam a moléculas da matriz extracelular do hospedeiro. Estas moléculas são abundantes, encontram-se em matrizes insolúveis e estão conservadas em várias espécies animais, pelo que o mecanismo se torna altamente vantajoso para as bactérias.¹

Entre as adesinas bacterianas encontram-se as proteínas de ligação à fibronectina (Fn) que é uma glicoproteína dimérica que se encontra no plasma e na matriz do espaço extracelular. A ligação das proteínas bacterianas à fibronectina facilita o processo de associação e internalização dos organismos invasores. A SFS e a FNE são proteínas extracelulares Fn-ligantes identificadas em *S. equi*.^{1,10,11} Estas proteínas não possuem o motivo de ancoragem à parede celular, pelo que o mecanismo pelo qual se efectua a adesão não lhes pode ser atribuído. A ligação de SFS e FNE à fibronectina faz-se através da ligação ao domínio de ligação ao colagénio, um fragmento com 40kDa após digestão com tripsina. Por outro lado, a FNEB, uma outra proteína de ligação à fibronectina mais recentemente descoberta, contém o motivo de ancoragem à parede celular.¹⁰ No entanto, a vacinação i.n. FNEB não resultou em imunização protectora.¹²

Fase II – Invasão do epitélio respiratório pelo *S. equi*

Após adesão, *S. equi* desenvolve um mecanismo de invasão do epitélio do tracto respiratório até atingir os nódulos linfáticos e vasos sanguíneos situados na *lamina propria*. Este mecanismo é dependente da acção de enzimas hidrolíticos, como o hialuronidase, que para além de facilitar a penetração nas membranas mucosas e tecido, desempenha um papel importante na utilização do ácido hialurónico do hospedeiro como fonte de carbono.

Toxinas citolíticas extracelulares, como a estreptolisina S, danificam células do sistema imunitário do hospedeiro, inibindo a resposta imune e facilitando a invasão.^{3,13}

Fase III – Resistência do microorganismo à fagocitose pelas células do sistema imunitário

Intimamente ligado com o processo de invasão está a defesa às respostas imunes inata e adaptativa dos hospedeiros, sendo que a resistência à fagocitose é a característica principal da patogénese desta infecção. *S. equi* expressa dois tipos de proteínas M que são reconhecidas pela sua capacidade antifagocítica, SeM e SzPSe, proteínas fibrilares com estrutura maioritariamente em α -hélice. SzPSe é homóloga da proteína M SzP

produzida por *S. zooepidemicus*, no entanto a homologia entre SeM e SzPSe reduz-se à sequência sinal e de ancoragem à membrana celular.¹⁴

A actividade antifagocítica das proteínas M encontra-se associada a duas propriedades essenciais: a ligação a imunoglobulinas e ao fibrinogénio (Fb), que por sua inibe a deposição do fragmento C3b do complemento na superfície bacteriana e reduz a fagocitose.

As proteínas M são também caracterizadas por induzirem a produção de anticorpos opsonizantes específicos para a espécie da qual deriva a proteína. SeM é imunogénica para *S. equi*, no entanto SzPSe apesar de ser altamente imunogénica para *S. zooepidemicus* não o é para *S. equi*. SeM é também responsável por 70% da ligação ao fibrinogénio, deixando a SzPSe um papel secundário nesta função.

Por estas razões acredita-se que SeM é a essência da resistência de *S. equi* à fagocitose, sendo que a função de SzPe na virulência de *S. equi* ainda não foi esclarecida.

O tamanho uniforme da proteína SeM (58 kDa) entre as várias estirpes de *S. equi* levava a crer que se trataria de uma proteína conservada. Estudos envolvendo estirpes isoladas geograficamente apontavam também neste sentido uma vez que se revelavam uniformemente susceptíveis a soro de animais recuperados de gurma, sugerindo que os epitopos seriam invariantes. No entanto, algumas bactérias isoladas expressam SeM com deleções no terminal amina até 25% da sequência completa. Por outro lado, foram já registadas alterações no alelo *SeM* nos animais infectados e durante surtos da doença, uma indicação de que as mutações em *SeM* podem ocorrer com elevada frequência e que existe uma pressão selectiva para as variantes com substituições no terminal amina.¹⁵ Esta variabilidade pode estar na base da persistência da doença, uma vez que a alteração dos epitopos faz com que as células do sistema imunitário do animal deixem de reconhecer a proteína.⁴

Um outro elemento importante na resistência à fagocitose por *S. equi* é a cápsula de ácido hialurónico. Estirpes acapsuladas, apesar de expressarem a proteína M em níveis semelhantes às estirpes com cápsula, apresentam uma redução significativa na resistência à fagocitose.^{1,16}

1.1.3 Prevenção e Tratamento

O tratamento da gurma com antibióticos não é consensual entre a comunidade veterinária pois, apesar de *S. equi* ser sensível à maioria dos antibióticos *in vitro*, revela-se ineficaz em situações em que os abscessos são já visíveis.

A administração numa fase inicial e aguda da doença pode prevenir a formação de abscessos, no caso de o antibiótico alcançar efectivamente o agente invasor. No entanto, este tratamento pode inibir o desenvolvimento da protecção imunitária, deixando os animais susceptíveis a uma reinfeção assim que o tratamento é descontinuado.⁴ Por outro lado, alguns veterinários temem que o tratamento com antibióticos vá apenas atrasar a maturação dos abscessos, podendo contribuir para disseminação do agente infeccioso pela circulação sistémica, levando ao estadio mais grave da doença que poder resultar em morte.⁸

Deste modo, a prevenção parece ser a solução mais viável e eficaz para erradicar a doença. Na verdade, 75% dos animais infectados desenvolve uma protecção imunitária que se mantém por longos períodos, alcançando os 5 anos, maioritariamente contra a proteína SeM.⁸ Os animais assim imunizados apresentam anticorpos IgG e IgA específicos anti-SeM tanto no soro como nas secreções nasais, pelo que esta proteína apresenta-se promissora como componente de vacinas. No entanto, a presença de IgG anti-SeM no soro de animais imunizados com lisatos bacterianos não se correlacionou com o nível de protecção após a infecção experimental, o que leva a crer que outras proteínas para além da SeM estarão envolvidas no processo de imunização.¹⁷ Apesar de não se conhecer a influência da variabilidade da SeM na protecção conferida por vacinas, esta poderá ser a causa da sua baixa eficácia.

Embora se encontrem em alguns mercados mundiais vacinas contra a infecção por *S. equi*, a protecção conferida desaponta as expectativas da erradicação da doença. Estas vacinas, compostas pela bactéria na sua forma atenuada ou ricas em extractos de SeM, com ou sem adjuvantes, não conseguem controlar efectivamente a doença e apresentam várias vezes efeitos adversos bastante graves.^{8,18}

Sheoran e Timoney apresentaram, em 1997, um trabalho que visava estabelecer a relação entre os isotipos de imunoglobulinas anti-SeM expressos em animais convalescentes e os imunizados com uma das vacinas do mercado, Strepguard® (extracto enzimático de *S. equi* com o adjuvante Havlogen®). Da comparação dos níveis

de anticorpos anti-SeM resultou que, apesar dos níveis de isotipos do soro serem semelhantes, os animais vacinados não apresentavam o mesmo tipo de resposta a nível das mucosas. Estes dados sugerem que a imunidade das mucosas pode ser bastante decisiva a nível da resistência adquirida contra a gurma. As imunoglobulinas presentes nas mucosas podem estar relacionadas, não só com a prevenção do desenvolvimento da doença como também, com o impedimento da entrada do agente infeccioso na nasofaringe.¹⁹

Embora o mecanismo de protecção não esteja ainda totalmente esclarecido, a baixa eficiência destas vacinas parentéricas a nível local voltou as atenções para outro tipo de vacinas.

Neste contexto, foi desenvolvida uma vacina intranasal (i.n.) (Pinnacle[®], Fort Dodge) contendo uma estirpe acapsulada derivada de mutagénese química aleatória. No entanto, este tipo de mutação é susceptível de sofrer reversão, pelo que, apesar da protecção poder ser total em certos casos, não foi permitida a sua comercialização na Europa, uma vez que existem dúvidas quanto à sua segurança. Efeitos adversos como corrimento nasal, linfadenite e abscessos submandibulares foram reportados após vacinação i.n..

A vacina Equilis StrepE[®] (Invert) contendo a estirpe TW 928 viva atenuada, administrada pela via parentérica, foi comercializada em alguns países da Europa, mas entretanto retirada do mercado devido ao desenvolvimento da doença em animais vacinados. A vacinação intramuscular, apesar de conferir protecção contra infecção por *S. equi*, proporcionou graves reacções no local de vacinação, pelo que foi adoptado a inoculação na mucosa do lábio superior. Mesmo nestas condições pequenas pústulas podem ser detectadas no local de injeção e há uma redução da percentagem de animais efectivamente imunizados. A duração do período de imunização é também diminuta, de apenas 3 meses, pelo que são exigidos vários reforços para se mantenha a protecção contra *S. equi*.^{4,20-22}

O recurso a vacinas com subunidades de várias proteínas imunogénicas de *S. equi* apresenta-se como uma alternativa às vacinas com o agente patogénico na forma atenuadas. Uma das aproximações mais recentes recorreu ao uso de sete antigénios numa vacina, Septavacc, cinco dos quais se prevê que se localizem à superfície da parede celular de *S. equi* (EAG, CNE, ScIC, SEQ0256 e SEQ0402) mediando a adesão, e dois provavelmente secretados, IdeE e IdeE2 com actividade de endopeptidase contra

a IgG. A vacinação de 7 cavalos resultou na protecção de 85% dos animais inoculados, não se observando efeitos adversos. Neste sentido, há o reforço da ideia de que as proteínas expostas na superfície bacteriana desempenham um papel bastante importante na indução da reposta imune.^{21,23}

A administração destas proteínas através das mucosas e co-administração com diferentes adjuvantes, incluindo sistemas de partículas, é outra alternativa que se tornou desejável, de modo a obter uma melhoria da resposta imune.

Neste sentido, foram já estudados os efeitos adjuvantes de nanopartículas de poli (ácido láctico) (PLA) e poli- ϵ -caprolactona (PCL), revestidas com mucoadesivos, com extracto enzimático de *S. equi* adsorvido ou encapsulado. Estas partículas provocaram uma resposta imune sistémica e das mucosas, pelo que os sistemas de veiculação mostram-se bastantes promissores para apresentação de antígenos de *S. equi*, sem necessidade de recurso a outro tipo de adjuvantes.^{24,25}

1.2 Vacinas

A prevenção de doenças infecciosas em humanos e animais, através da vacinação, provou ser o método mais eficaz ao longo do século XX. Em medicina veterinária o controlo e erradicação de doenças como a cólera suína e enterite parvoviral foram alcançados através de programas de vacinação.²⁶

A definição de uma vacina eficaz exige a capacidade desta estimular o sistema imunitário, de modo a que o hospedeiro possa responder de uma forma rápida e efectiva ao ataque de um agente patogénico específico, de maneira a prevenir ou limitar uma infecção.

As vacinas tendem a adoptar algumas características dos agentes patogénicos, de modo a activar o sistema imunitário mas sem causar a doença propriamente dita. Deste modo, as vacinas tendem a exibir uma natureza semelhante à dos agentes patogénicos, com partículas de tamanhos semelhantes e que podem conter padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) altamente conservados, estimulando o sistema imunitário através dos receptores para reconhecimento de padrões (PRR).²⁷

1.2.1 A resposta imunitária

A vacinação leva a activação do sistema imunitário que por sua vez compreende dois tipos de mecanismo de defesa: o sistema inato e o adaptativo.

O sistema inato constitui a primeira linha de defesa contra o agente invasor, reconhecendo-o e respondendo imediatamente a uma invasão microbiana. A resposta inata é composta maioritariamente pelo sistema do complemento e pelas células fagocíticas que ingerem e matam os patógenos. Este sistema depende de PRR que reconhecem os PAMP, sendo os *toll-like receptors* (TLR) a classe de PRR mais bem caracterizada. Assim que os receptores reconhecem partículas estranhas, desencadeia-se uma cascata de sinais intracelulares, que dão início a resposta imune inata, essencialmente inflamatória. Desta resposta resulta a destruição dos patógenos e o estímulo da resposta imune adaptativa, através de um processo conhecido por apresentação de antígenos, o qual é essencial para a erradicação específica de microrganismos e para o estabelecimento de memória do sistema imunitário.

As células com capacidade para capturar antígeno, processá-lo e apresentá-lo a outras células são as chamadas células apresentadoras de antígeno profissionais (APCs) entre as quais se encontram as células dendríticas (DCs) e os macrófagos.

Macrófagos – o monoblasto, precursor dos macrófagos, diferencia-se em monócitos e permanece durante 24h na medula óssea entrando depois na circulação sanguínea. Da circulação periférica os monócitos migram para o tecido extravascular onde se diferenciam em macrófagos. Estes macrófagos colonizam o fígado, pulmões, baço, nódulos linfáticos, timo, intestino, medula óssea, cérebro e tecido conectivo. Os macrófagos migram para um foco de infecção atraídos por uma variedade de substâncias incluindo componentes das bactérias, endotoxinas, componentes do complemento e fragmentos de colagénio. Assim que detectam o organismo invasor, os macrófagos podem fagocitar e eliminar o organismo e ao mesmo tempo gerar fragmentos imunogénicos importantes na indução da resposta imune.²⁸

Células dendríticas - As células dendríticas têm um papel preponderante na iniciação da resposta imunitária. Estas células patrulham os tecidos periféricos no estado de células imaturas, iniciando o seu processo de maturação após a captura dos antígenos. Após processamento dos antígenos os péptidos que são carregados em moléculas do complexo de imunohistocompatibilidade (MHC) da classe I ou II, ocorrendo migração para os órgãos linfóides secundários. Nestes órgãos as células tornam-se apresentadoras de antígeno eficientes, resultando na activação de linfócitos T *naive*, e diferenciação dos linfócitos B, levando à iniciação de uma resposta imune específica contra o antígeno ou por outro lado à tolerância imunológica.²⁹

O sistema imune adaptativo constitui a segunda linha de defesa, capaz de forjar respostas altamente específicas contra os agentes patogénicos. Após a apresentação de antígeno aos receptores específicos na superfície dos linfócitos T e B, ocorre o despoletar das respostas imunes celular e humoral.

Os linfócitos T dividem-se em duas grandes linhagens: os linfócitos T auxiliares (Th), que expressam CD4+ e os linfócitos T citotóxicos (CTL) que expressam CD8+ à superfície.

Por sua vez os Th podem ser divididos em várias subpopulações, entre as quais Th1 e Th2 são as mais importantes. Esta divisão baseia-se principalmente no tipo de citocinas que segregam, sendo que os linfócitos Th1 medeiam a componente celular da resposta imune através da produção de citocinas como a interleucina 2 (IL-2), interferão

γ (INF- γ) e factor necrosante tumoral beta (TNF- β), citocinas estas que entre outros mecanismos activam as CTLs e aumentam a fagocitose. Por sua vez, as CTLs possuem o poder de eliminar as células infectadas, por um mecanismo mediado por anticorpos.

Os linfócitos Th2 caracterizam-se pela secreção de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 e medeiam a componente humoral da resposta. Estes linfócitos promovem a circulação de anticorpos e têm uma acção efectiva contra os agentes patogéneos extracelulares.

Após activação as Th vão estimular os linfócitos B na produção de imunoglobulinas. A este nível a resposta Th1 caracteriza-se maioritariamente pela presença de IgG2a (e IgA) e a resposta Th2 pela expressão de IgG1.

Linfócitos T específicos reconhecem através dos TCR fragmentos peptídicos ligados ao complexo major de histocompatibilidade (MHC), que podem ser moléculas do tipo I ou II, e que apresentam os antígenos na superfície das APCs.²⁷

Os antígenos intracelulares (como as proteínas virais) levam à apresentação de antígeno pelas moléculas MHC-I que por sua vez activam os linfócitos T CD8+ a CTLs. Os antígenos extracelulares são endocitados e apresentados em moléculas MHC-II para activação das células Th CD4+.

1.2.1.1 Imunidade das mucosas

O sistema imunitário das mucosas pode ser dividido em dois compartimentos gerais, distinguidos como locais efectores e indutores. Os locais indutores, são áreas onde a apresentação de antígeno leva a uma activação das células do sistema imunitário, e os locais efectores são locais onde os anticorpos e células do sistema imunitário desempenham a sua função.

Do sistema imunitário das mucosas fazem parte os tecidos linfóides associados às mucosas (MALT) e glândulas secretoras externas.

Os principais locais de indução do sistema imunitário das mucosas são os MALT, entre os quais o tecido linfóide associado aos intestinos (GALT), o tecido linfóide associado aos brônquios (BALT), o tecido linfóide associado à nasofaringe (NALT) e o tecido linfóide associado à mucosa genital (GENALT).

A imunoglobulina do isotipo A (IgA) é numa fase inicial produzida no tecido linfóide da mucosa, e depois selectivamente secretada por um mecanismo mediado por um receptor de Ig polimérico (sIgA).

Em ratinhos o NALT encontra-se em ambos os lados dos ductos nasofaríngeos e a apresentação de antígeno neste tecido induz uma resposta imune das mucosas e/ou sistémica ou a indução de tolerância. Este tecido encontra-se povoado por folículos de células B e T, células M especializadas contendo folículos de APC e nódulos linfáticos. Quando um antígeno é apresentado na mucosa nasal, especialmente sob a forma de partícula, é activamente transportado primeiramente para as células M de modo a alcançar as APC, para processamento e apresentação aos linfócitos T.³⁰

A maior parte das células efectoras nas superfícies da mucosa, estimada em 80%, é constituída por linfócitos CD8+ e CD4+. A activação de células T CD4+ é feita por várias APC como os macrófagos, DC e linfócitos B, enquanto que as células T CD8+ podem ser activadas por uma grande variedade de células de modo a tornarem-se citotóxicas. A proximidade de APC e células do sistema imunitário dos locais indutivos das mucosas, torna-se portanto essencial para que ocorra uma resposta imunitária eficiente.²⁶

1.2.2 Tipos de vacinas

As vacinas podem exibir vários níveis de imunogenicidade, estabilidade e segurança de acordo com o tipo de antígeno que é usado. As vacinas com patógenos atenuados podem ser bastante eficazes na medida em que mimetizam a infecção e respostas imunes celular, das mucosas e humoral naturais. No entanto, e como já referido no caso de vacinas com *S. equi* na forma atenuada, estas podem levantar problemas de segurança devido a um processo de atenuação insuficiente podendo reverter para a estirpe original (*wild-type*), e acabar por induzir a doença na sua totalidade.

Em alternativa aos organismos atenuados existem os patógenos inactivados, que apesar de induzirem uma resposta menos efectiva, com uma produção de CTLs deficiente, conseguem estimular a produção de anticorpos específicos.²⁶

Vacinas de subunidades são constituídas por proteínas antigénicas, polissacáridos ou proteínas recombinantes, que normalmente requerem a utilização de adjuvantes ou administrações múltiplas, por serem menos imunogénicas.³¹ Este tipo de antígenos não consegue induzir uma resposta imune do tipo celular, uma vez que são processados como antígenos exógenos. Quando presentes na circulação sistémica estas subunidades, que exibem um elevado grau de ligação às proteínas, são facilmente eliminadas após administração. As proteínas são susceptíveis à degradação por proteases e apresentam baixa biodisponibilidade, uma vez que não conseguem atravessar facilmente as membranas. As subunidades assim apresentadas nas mucosas induzirão uma resposta imune fraca, pelo que as alternativas que se apresentam são uma purificação que se revela dispendiosa ou a associação a sistemas de veiculação que protejam as proteínas da degradação.²⁶

Por último, existem as vacinas produzidas com material genético, vacinas de DNA. Nestas vacinas o gene do antígeno de interesse é isolado e inserido num plasmídeo bacteriano que depois pode ser administrado directamente, inserido num vector bacteriano ou viral ou incorporado num sistema de entrega do tipo nanopartícula.³²

1.2.3 Vias alternativas: as mucosas

Grande parte das vacinas disponíveis hoje em dia é administrada por via parentérica, o que provoca uma resposta imune com forte componente sistémica, mas que negligencia a imunidade das mucosas.³⁰

Tendo em conta que a maioria dos patógenos ataca o hospedeiro através da superfície das mucosas, como sendo os tractos respiratório superior, gastrointestinal, vaginal e urinário, torna-se evidente a necessidade de gerar uma “primeira linha de defesa” a nível das mucosas. Este tipo de imunidade é mais definitivo quando o antígeno é apresentado no MALT levando à produção da imunoglobulina A secretória.²⁶

Por outro lado, vacinas dirigidas às mucosas têm o poder, não só de estimular imunidade das mucosas, como também de provocar uma resposta imunitária sistémica análoga à provocada pelas vacinas administradas pela via parentérica.³¹

Neste sentido, a vacinação das mucosas via oral ou nasal é um processo simples, que não envolve a esterilização da vacina, o que melhora a estabilidade e torna o processo de produção muito mais barato.³²

Por outro lado, uma inoculação das mucosas bem sucedida requer a entrega do antígeno de forma eficaz, o que constitui um desafio no desenvolvimento das vacinas. Apesar da imunização das mucosas ser bastante desejável, este processo depara-se com algumas barreiras difíceis de transpor. As mucosas consistem principalmente de tecido epitelial bastante vulnerável, com secreção de muco viscoso que actua como uma barreira primária contra patógenos e simultaneamente contra os antígenos das vacinas. Estas características tornam-se desfavoráveis uma vez que podem diminuir o tempo de residência dos antígenos e torna-se difícil saber qual a quantidade que efectivamente penetra na mucosa.³³ Deste modo é importante que estas vacinas tenham a capacidade de efectivamente penetrar no muco, sem danificar as células epiteliais, penetrar ou permearem-se através do epitélio e interagir com as APC em circulação ou interagir directamente com o MALT.³⁴

A mucosa nasal é uma opção atractiva para a imunização das mucosas, uma vez que não apresenta a mesma acidez associada à via oral, existindo também uma redução da superfície mucosal.³⁰

Neste sentido, os sistemas de partículas para a administração de antígenos pela via intranasal pode ser vantajosa em vários aspectos:

- Protecção do antígeno dos enzimas das mucosas;
- Facilitam a captura preferencial pela células especializadas M do NALT;
- Libertação sustentada de antígeno, aumentando o tempo de contacto entre antígeno e APCs;
- Possibilidade de aumentar o tempo de retenção no local de administração através de bioadesão.

1.2.4 Adjuvantes

Verificou-se ao longo dos anos no campo da experimentação profiláctica, que certos agentes sem efeito de antígeno específico, potenciam a resposta imunitária de algumas vacinas com antígenos menos reactivos, a que se chamaram de adjuvantes.

Estes componentes são definidos como moléculas, compostos ou macromoléculas complexas que aumentam a potência, longevidade da resposta imune específica a antígenos, sem provocarem toxicidade ou reacção imune contra eles próprios.³⁵

Os adjuvantes podem-se dividir em duas classes principais: sistemas de veiculação de antígeno (emulsões, micro e nanopartículas, complexos imunoestimuladores (ISCOMs) e lipossomas) e adjuvantes imunestimuladores (lipopolissacárido (LPS), monofosforil lipido A, muramilpeptídeos, etc).³¹

Quando os antígenos são injectados na forma solúvel apenas uma pequena parte chega até às APCs, pelo que um sistema de transporte e entrega eficiente se torna altamente desejável.²⁸ Uma vez que os sistemas de partículas possuem dimensões semelhantes às dos agentes patogéneos, são facilmente identificadas e fagocitadas e reconhecidas pelas APCs. Os adjuvantes imunoestimuladores podem ser associados às nanopartículas de modo a melhorar a amplitude da resposta imune e a gerar um tipo específico de resposta (Th1 vs. Th2)³¹

Os adjuvantes podem exercer a sua função de acordo com 6 conceitos de acção, que não são obrigatoriamente exclusivos:

- O adjuvante actua como sinal, ligando-se às APCs (adjuvante mimetiza PAMPs);
- Efeito geográfico (aumento da captura, transporte e apresentação do antígeno pelas APCs nos órgãos linfóides);
- Co-estimulação (estimula apresentação de moléculas co-estimuladoras pelas APCs);
- Sinal de perigo (provocado pelo stress/destruição de tecidos);
- Efeito reservatório (apresentação de antígeno prolongada; agregação no local de injeção);
- Indução de CTLs (processamento do antígeno no citosol).²⁷

Tipos de resposta: Th1vsTh2

O tipo de resposta imunitária depende não só da via usada na vacinação como também da dosagem de antígeno, o tempo em que o antígeno está presente, frequência das imunizações e o tipo de moléculas co-estimuladoras usadas.

A grande parte dos adjuvantes aprovados para uso humano provoca uma resposta imune maioritariamente do tipo Th2. No entanto, e para certos tipos de patologia, é importante induzir uma resposta do tipo Th1.³⁶

A composição química de cada vacina é fulcral na definição do tipo de resposta imune que se irá desenvolver, que tipo de anticorpos os linfócitos B irão produzir e que tipo de citocinas os linfócitos T irão secretar. Toda esta cascata de acontecimentos pode ser controlada através da combinação de antígenos com moléculas imunomodulatórias ou co-estimuladoras.³⁷

A indução do tipo apropriado de resposta imune é essencial para um desenvolvimento de uma imunidade protectora. A forma sob a qual o antígeno é apresentado (ex.: sob a forma solúvel ou encapsulado), o sistema de veiculação, e a via pela qual é administrado influenciam a razão Th1/Th2 e tipo de resposta imune (celular ou humoral) subsequente à vacinação.^{26,37,38}

Apesar de serem poucos os adjuvantes aprovados para uso humano, existem vários tipos de substâncias com comprovada capacidade adjuvante, mas que ao mesmo tempo levantam questões relacionadas com toxicidade e possibilidade de efeitos secundários. Os sais de alumínio foram o primeiro adjuvante aprovado para uso humano e começaram a ser utilizados por volta de 1930, no entanto hoje em dia na EU apenas são permitidos mais dois tipos de adjuvantes: MF59 e AS04 (Tabela 1.1).

No uso veterinário os adjuvantes estão sujeitos a regras menos apertadas, sendo que para situações de imunização de animais saudáveis, são aceites adjuvantes que induzam efeitos adversos locais ou sistémicos mínimos. Por outro lado, o desenvolvimento de adjuvantes para uso veterinário deve ter em vista custos reduzidos, facilidade de produção, estabilidade e aplicabilidade a uma vasta gama de vacinas.³⁹

Foram já estudados vários tipos de associações entre *S. equi* e adjuvantes e serão estes que serão de seguida mais profundamente explorados.

Quadro 1.2.4.1 – Resumo de adjuvantes aprovados para uso humano e adjuvantes estudados na associação com antígenos de *S. equi*.^{4,17,26,37,39}

Tipos de adjuvante	Exemplos	Aprovados para uso humano	Associados a <i>S. equi</i>
Sistemas de partículas	Hidróxido de alumínio, fosfato de alumínio, sulfato de alumínio de potássio	✓	✓
	Fosfato de cálcio MF59	✓	
	AS04 (lipossomas contendo MPLA e QS-21)	✓	
	Micro e nanopartículas de PLGA		✓
	Nanopartículas de PCL		✓
	Complexos imunoestimuladores (ISCOMs [®] e ISCOMATRIX [®])		✓
	Adjuvante de Freund (completo e incompleto)		✓
	Toxina colérica		✓
	Sucrose acetato isobutirato		✓
	Monofosforil lípido A (MPLA)		✓
	Havlogen [®]		✓

1.2.4.1 Sais de alumínio:

Hidróxido e fosfato de alumínio funcionam como depósito de antígeno, uma vez que o antígeno é adsorvido ao hidrogel de alumínio, sendo que a quantidade de antígeno adsorvido depende das ligações que se estabelecem entre este e o adjuvante. A sua associação a outros adjuvantes é eficaz em alguns casos, encontrando-se já aprovada para uso humano com lipossomas, QS-21 (uma saponina) e MPLA.

Apesar de ser utilizado há mais de 80 anos em vacinas, e ser considerado um adjuvante seguro, encontra-se associado a vários secundários indesejáveis entre os quais eritemas, granulomas e indução da IgE e IL-4 que estão associados a alergias e hipersensibilidade. Uma outra desvantagem dos sais de alumínio é a indução de uma resposta imunitária desequilibrada, essencialmente do tipo Th2 com carácter humoral pronunciado, havendo reduzida estimulação da imunidade celular. Uma vez que estes adjuvantes incluem a formação de depósitos de antígeno no local de aplicação, tornam-se desaproprados para imunizações intranasais e orais.

A associação de antígenos de *S. equi* com sais de alumínio é muito recorrente em estudos de imunização pela via intramuscular e sub-cutânea.⁴⁰⁻⁴²

1.2.4.2 ISCOMs e ISCOMATRIX

Estes complexos imunoestimuladores sintéticos são sintetizados a partir de colesterol, lípidos e saponinas derivadas de plantas. As interações criadas entre estes elementos cria uma espécie de jaula, com cerca de 40 nm, que encapsula o antígeno e o apresenta eficientemente as APCs. No entanto, as saponinas têm propriedades hemolíticas e acabam muitas vezes por provocar reacções tóxicas a nível dos tecidos. Estes compostos são usados na vacinação veterinária, mas a sua utilização em humanos está longe de ser consensual, sendo que é necessário um balanço aceitável entre potencial e reacções adversas.

Os ISCOMS podem-se caracterizar como partículas esféricas, em que provavelmente a maioria dos antígenos se localiza expostos na superfície, imitando desta forma um microorganismo, possuindo um tamanho semelhante.⁴³

Os ISCOMs possuem a capacidade de fusão com as membranas celulares entregando o antígeno no citosol das células alvo, o que resulta no processamento endógeno e apresentação dos péptidos via MHC I.

ISCOMATRIX é idêntica aos ISCOMs à excepção de não conter o antígeno, sendo apenas uma mistura entre os dois. A ISCOMATRIX apresenta as mesmas vantagens dos ISCOMs como sendo a captura preferencial pelas APCs. Estudos de imunização em animais com a ISCOMATRIX revelaram uma boa performance a nível das IgA das mucosas. No entanto, o tipo de respostas imunes para ISCOMs e ISCOMATRIX variam, sendo a primeira uma resposta mista e a segunda mais relacionada com o tipo Th2.

O ISCOMATRIX (Matrix-S) já foi utilizado em combinação com proteína recombinantes da membrana de *S. equi*, resultando num efeito sinérgico significativo.^{12,44}

1.2.4.3 Adjuvante de Freund (Completo e incompleto)

Pertence à classe das emulsões num sistema água em óleo mineral, sendo que o adjuvante incompleto não tem *M. tuberculosis* inactiva, presente no adjuvante completo. O seu mecanismo de acção inclui também um efeito “reservatório” no local de injeção, permitindo uma libertação lenta do antígeno e o estímulo prolongado das APCs.

O adjuvante completo é capaz de induzir elevados níveis de anticorpos, mas o seu nível de reactogenicidade é tão elevado que o seu uso é desencorajado mesmo em animais de laboratório. O adjuvante incompleto apesar de bastante poderoso não é usado em profilaxia visto a relação potencial/efeitos secundário (como reacções inflamatórias, granulomas e úlceras no local de injeção) não o justificar.

Este tipo de adjuvante é um dos mais comuns nos estudos com *S. equi*, sendo principalmente usado para produção de antisoros.^{14,45}

1.2.4.4 Monofosforil lípido A (MPLA)

Os extractos de bactérias gram-negativas demonstram um forte potencial adjuvante ao mesmo tempo que se revelam demasiado tóxicos para uso humano. No entanto, reconhece-se o lípido A presente no lipopolissacárido (LPS) como sendo o maior responsável pela toxicidade destes extractos. Deste modo, e a partir da hidrólise do lípido A, que apresenta as mesmas capacidades adjuvantes deste componente do LPS obtém-se o MPLA, com a vantagem de não apresentar o mesmo tipo de toxicidade.

Assim como o LPS, presume-se que o modo de acção do MPLA seja através da interacção com as APC, levando à libertação de IL-12 e IFN- γ , os quais promovem a maturação de células dendríticas e migração dos linfócitos T. Em estudos animais verificou-se que o tipo de resposta imune Th1 é predominante, havendo produção de IgA na forma secretada. É normalmente formulado em emulsões de modo a potenciar a sua imunogeneidade, mas a sua associação a outros adjuvantes, como sais de alumínio e outros que funcionem como reservatório de antígeno, parece ser mais proveitosa.

Este adjuvante foi já utilizado em vários ensaios sobre o potencial imunoprotector da proteína de ligação ao fibrinogénio (FbBP) de *S. equi*.^{46,47}

1.2.4.5 Toxina da cólera (CT) e enterotóxina termolábil de *E. coli* (LT)

As toxinas bacterianas são altamente imunogénicas, sendo que a CT e a LT são bastante potentes a nível da imunização das mucosas quando co-administradas com o antígeno. Uma vez que são consideradas demasiado tóxicas para uso humano foram manipuladas de modo a reduzir o seu nível de toxicidade.

Apesar de LT e CT serem praticamente homólogas, CT estimula predominantemente uma resposta do tipo Th2, enquanto que LT privilegia uma resposta mista Th1/Th2.

Sendo um adjuvante da resposta imune das mucosas por excelência a sua associação a *S. equi* torna-se lógica. O acoplamento de CT a um péptido da proteína SeM resultou em níveis de anticorpos semelhantes aos presentes em animais em convalescência, no entanto não se mostraram protectores após infecção com *S. equi*.⁴⁸

1.2.4.6 Micro e Nanopartículas Poliméricas

Entre os sistemas de partículas transportadores de antígeno mais estudados encontram-se as micro e nanopartículas poliméricas. Estas esferas possuem tamanhos desde a ordem dos nano aos micrómetros e caracterizam-se por serem biocompatíveis e biodegradáveis. Têm a vantagem de possuírem um tamanho semelhante aos agentes patogénicos que normalmente atacam o sistema imunitário, sendo que as APC se encontram mais vigilantes contra estas partículas.³⁵ A libertação, prolongada no tempo, dos antígenos adsorvidos e/ou encapsulados à superfície das partículas é fundamental na estimulação do sistema imunitário, podendo eliminar a necessidade de reforço. Além disso outros adjuvantes podem ser incorporado neste sistema, aumentando a resposta imunitária e diminuindo os efeitos adversos causados por estes adjuvantes. Os sistemas de partículas podem também apresentar múltiplas cópias do antígeno à sua superfície, o que estimula grandemente a activação dos linfócitos B.

Enquanto que os antígenos solúveis são internalizados por macropinocitose, os que se encontram encapsulados em partículas poliméricas são fagocitados, sendo mais eficientemente apresentados pelas moléculas MHC, estimulando também a resposta imune mediada por células.

No entanto, na preparação destas partículas, são muitas vezes usados solventes orgânicos e elevadas temperaturas que podem levar à degradação ou desnaturação do próprio antígeno durante o processo de encapsulação.

Em estudos de imunização contra a gurma, microesferas de PLGA encapsulando antígenos totais de *S. equi* induziram protecção em animais de laboratório.¹⁷ No entanto, e tendo em conta que o PLGA é bastante dispendioso a utilização de polímeros alternativos capazes de também induzir protecção seria bastante vantajosa.

Deste modo testou-se como alternativa a associação de antígenos de *S. equi* totais a micro e nanopartículas de poli (ácido láctico) (PLA) e poli-ε-caprolactona (PCL) na imunização de ratinhos. Não havendo possibilidade de confirmar a protecção conferida por esta vacina, determinou-se apenas o tipo de resposta imune, caracterizada pela expressão de anticorpos específicos contra *S. equi* e por uma componente mista do tipo Th1/Th2.^{24,25}

1.2.4.7 Quitosano

O quitosano é um derivado da quitina, obtido através de diacetilação alcalina e que apresenta uma carga superficial positiva. Ao contrário da quitina, o quitosano é facilmente dissolvido em soluções ácidas diluídas e possui bastantes grupos amina livres disponíveis para criar várias ligações químicas. O quitosano possui também várias propriedades bioactivas, como actividade antimicrobiana, anti-inflamatória, hemostática, cicatrização e actividade imunogénica.³⁵

O quitosano, como polímero bioadesivo não tóxico e não alergeno, tem sido extensivamente utilizado em formulações de vacinas e fármacos para serem administrados pelas vias mucosas.

Acredita-se que o quitosano possua a capacidade de abrir as *tight junctions* de células do epitélio polarizadas, aumentando a permeação de vários compostos. Apesar de ser usado como um adjuvante na vacinação das mucosas, a sua forma pode impedir que consiga ultrapassar a barreira das mucosa, pelo que este adjuvante é mais bem sucedido quando aplicado em combinação com outros.⁴⁹

A administração nasal de partículas de quitosano resulta na estimulação do sistema imunitário, obtendo tanto respostas humorais como celulares. No entanto, são as

suas propriedades mucoadesivas que lhe conferem grande vantagem, proporcionando um longo período de contacto entre a formulação e mucosas nasais.⁴⁹ Como mucoadesivo o quitosano encontra-se em grande vantagem uma vez que exhibe actividade imunestimuladora e aumenta a capacidade de permeação das micropartículas.

Algumas das partículas de PCL mencionadas acima no estudo da imunização de ratinhos, foram revestidas com quitosano, tendo-se verificado que este polímero mucoadesivo aumentava efectivamente a produção de IgA específicas nas mucosas contra *S. equi*.²⁵

1.3 Lipossomas

Os lipossomas são vesículas esféricas constituídas por lípidos naturais ou sintéticos, com um centro hidrófilo, organizadas em uma ou mais bicamadas fosfolipídicas constituídas por lípidos naturais ou sintéticos.⁵⁰

A capacidade dos lipossomas encapsularem solutos e selectivamente permeá-los tornou-os, quando primeiramente descobertos, num modelo de membranas celulares por excelência. Esta capacidade de retenção e protecção de solutos rapidamente levou à evolução da utilização destas partículas como transportadores de fármacos, macromoléculas e também como potenciadores da resposta imune através da encapsulação de antigénios.⁵¹

Os lipossomas representam uma plataforma altamente flexível, podendo variar o tamanho, número de bicamadas e carga superficial. Dependendo do método de preparação podem resultar vesículas uni-, oligo- ou multilamelares com uma, algumas ou muitas bicamadas respectivamente. O diâmetro também pode variar bastante indo dos 20 nm (vesículas unilamelares pequenas ou SUV) aos 200 µm (vesículas unilamelares grandes ou LUV) e as vesículas multilamelares (MLV) possuem um diâmetro médio entre 1 e 2 µm. A variação da composição lipídica faz também variar a carga superficial, resultando em lipossomas neutros ou carregados positiva ou negativamente.⁵¹⁻⁵⁴

Devido à sua natureza lipídica, substâncias lipófilas podem ser incorporados na bicamada fosfolipídica, enquanto que as substâncias hidrófilas ficam no interior aquoso do lipossoma, o que se pode traduzir num sistema vantajoso de protecção e direccionamento de fármaco. A evolução na investigação deste sistema ditou o aperfeiçoamento da composição destas partículas, permitindo direccioná-las para os locais de interesse, evitando a captura precoce pelos elementos do sistema fagocítico, quando este não é o alvo.

O design dos lipossomas tem que ter em conta o tempo de circulação desejado, associado ao tempo de retenção do fármaco ou à capacidade de direccionar para as células ou tecidos de interesse, de modo a que o fármaco seja libertado no local de acção.⁵³ Podem também ser adaptados em relação a alvos específicos de vacinas variando a sua composição.

Para além da classificação segundo o tamanho e número de lamelas, os lipossomas podem ainda ser classificados de acordo com a carga ou segundo a interacção com o meio biológico. Segundo esta classificação os lipossomas podem-se distinguir entre:

Lipossomas convencionais – Quando administrados pela via venosa possuem tempos de meia vida muito reduzidos, pois são rapidamente capturados pelo sistema mononuclear fagocítico (SMF), nomeadamente pelos macrófagos. Estes lipossomas são dirigidos passivamente para órgãos que possuem um endotélio descontínuo como o fígado, baço e medula óssea. Deste modo, tornam-se veículos eficientes no transporte de fármacos para tratamento de infecções localizadas no SMF, como sendo no tratamento da leishmaniose e na entrega de antígenos às APC.⁵⁵

Os lipossomas são opsonizados por proteínas como as imunoglobulinas, fibronectina e beta-2-macroglobulina levando ao reconhecimento como partícula estranha pelo SMF. Por outro lado, o complemento também possui um papel activo no reconhecimento dos lipossomas, levando à sua destabilização.

Existem já no mercado algumas formulações lipossomais convencionais, sendo que a primeira, Ambisome[®], encapsula o antifúngico a anfotericina B e encontra-se na forma liofilizada.⁵⁵

Lipossomas de circulação prolongada (longo tempo de circulação) – A estabilização estérica dos lipossomas, através da adição de polímeros hidrófilos à superfície lipossomal, permite prolongar o tempo de circulação dos lipossomas. Este conceito baseia-se no facto de os polímeros, como o polietilenoglicol (PEG), possuírem uma cadeia flexível que ocupa o espaço imediatamente adjacente à superfície dos lipossomas, excluindo assim o contacto de outras macromoléculas. Deste modo, não ocorre a opsonização dos lipossomas e é inibida a acção dos macrófagos contra estas vesículas. Por outro lado, as cadeias de PEG impedem a aglomeração dos lipossomas, tornando-as mais estáveis. A estabilização estérica dos lipossomas permite-lhe maior tempo de circulação, uma vez que reduz as interacções com as proteínas do soro.

Doxil[®] é uma suspensão líquida com lipossomas com diâmetros entre 80 e 100 nm que se encontra no mercado europeu desde 1996. Esta formulação é estericamente estabilizada e contém doxorubicina. Devido ao seu tamanho reduzido, com uma

bicamada lipídica electricamente neutra, existe uma diminuição das ligações dos componentes do plasma.⁵⁶

Imunolipossomas – Servem para direccionar os lipossomas a tecidos específicos e provocar a acumulação de fármaco no local alvo. Este vector inclui a associação de lipossomas com anticorpos, ligandos de receptores, factores de crescimento ou qualquer outra molécula ou macromolécula capaz de reconhecer e se ligar especificamente às células alvo, proporcionando a internalização dos lipossomas ou do fármaco encapsulado.

Estes lipossomas fazem uso da estabilização estérica por polímeros como o PEG de modo a não serem reconhecidos pelo sistema imunitário prematuramente, sendo que na maioria dos casos, as moléculas directoras se encontram ligadas às cadeias de PEG que se encontram à volta dos lipossomas.

A maior área terapêutica para este tipo de lipossomas é o cancro, uma vez que na superfície das células tumorais encontram-se várias moléculas específicas, o que permite um direccionamento eficaz e redução da toxicidade de muitos dos citostáticos usados no tratamento destas doenças. No entanto, é ainda necessário resolver várias questões antes que esta tecnologia possa ser usada *in vivo*. Alcançar o tempo de circulação suficiente até atingir os órgãos ou tecido alvo e encontrar o ligando ou receptor na células alvo suficientemente específicos, são ainda questões por resolver.⁵⁷

Complexos lipossomas catiónicos - DNA – os lipossomas catiónicos encontram-se entre os melhores vectores de transfecção na terapia génica. Os lipossomas carregados positivamente estabelecem ligações electrostáticas com os grupos fosfato do DNA, promovendo a sua condensação entre os lipossomas. O empacotamento de DNA plasmídico, entre lipossomas catiónicos, protege o material genético da degradação, facilita a sua entrada na células por endocitose e evita a degradação endossomal, entregando os ácidos nucleicos no citoplasma.³⁶

1.3.1 Lipossomas como adjuvantes

Devido à sua capacidade de encapsulação/associação de antígenos, assim como de compostos imunomoduladores e veiculação facilitada a células do sistema imune,

atribui-se aos lipossomas grande potencial adjuvante. Por outro lado, além de aumentarem a veiculação de antígenos às células do sistema imunitário e de protegerem o antígeno, os lipossomas têm também a propriedade de aumentar/modelar as propriedades imunogênicas das vacinas. Em alguns casos, no entanto, os lipossomas mostram-se pouco imunogênicos pelo que se torna necessário adicionar componentes imunoestimuladores.²⁷

Os lipossomas são maioritariamente eliminados da circulação sistêmica pelas células do SMF (macrófagos) e pelos hepatócitos.⁵⁸

O mecanismo pelo qual os lipossomas exercem o seu poder adjuvante ainda não está totalmente clarificado, no entanto o direcionamento passivo, devido à sua natureza semelhante a patógenos, a macrófagos do SMF é provavelmente o mecanismo preferencial.³¹ Dependendo da sua composição lipídica, os lipossomas podem também interagir com macrófagos e células dendríticas através dos seus receptores, como o CD1a, após activação pelo complemento. Deste modo, acredita-se que a formação de um depósito de antígeno no local de aplicação e a tendência e facilidade com que apresentam o antígeno à APCs, estão na base do seu poder adjuvante.²⁹

As características físico-químicas dos lipossomas como a carga e fluidez da bicamada, podem ter grande influência na maneira como são reconhecidos pelo sistema imunitário. Apesar de não se conhecerem os factores que definem a absorção pelas várias células, os diferentes níveis de ligação para uma dada composição lipossomal, com diferentes tipos de células, sugere que o passo de adesão/ligação seja crucial.⁵⁹

A carga pode também ter influência na eficiência de encapsulação do antígeno uma vez que a maioria dos antígenos possuem carga total negativa, associam-se mais facilmente aos lipossomas positivos.

No entanto, existem desvantagens e riscos associados à incorporação de antígenos:

- Destabilização do antígeno durante a produção das partículas ou após administração;
- Dificuldade na produção a nível industrial;
- Custos mais elevados em comparação com vacinas de soluções simples;
- Libertação limitada do antígeno.

1.3.1.1 Internalização de lipossomas

Sendo um pré-requisito para a apresentação de antígeno a sua introdução pela via endossomal ou citosólica, os lipossomas têm duas vias possíveis de internalização.

A situação mais comum é o lipossoma ser endocitado e apresentado pelas moléculas de MHC II na superfície das APC. A interacção dos lipossomas com as células fagocíticas passa por diferentes fases, iniciando-se com a adesão estável do lipossoma à superfície celular, seguindo-se de um mecanismo de endocitose pelo qual o lipossoma é transportado para o interior da célula e finalmente a fusão dos lipossomas com lisossomas, culminando na libertação do conteúdo lipossomal no interior da célula.²⁸

No entanto, certos tipos de lipossomas, como os com capacidade fusogénicas, também podem se fundirem com a membrana celular, entregando o antígeno directamente no citoplasma celular, levando assim os antígenos associados a estes lipossomas a serem apresentados pelas moléculas da classe MHC I.²⁹ Os lipossomas fusogénicos podem-se obter a partir de lípidos derivados de organismos como *Saccharomyces cerevisiae* (saccharosomas) ou *Escherichia coli* (escheriosomas) que medeiam a fusão dos lipossomas com a membrana plasmática das APC.²⁷

Estudos *in vitro* demonstram que lipossomas aniónicos, contendo fosfatidilserina (PS), interagem de forma débil com as DC sendo fracamente internalizados, e que os lipossomas carregados positivamente, pelo contrário, são facilmente internalizados pelas DCs.²⁹ Estes factos são uma confirmação das descrições prévias de que partículas carregadas positivamente são mais facilmente internalizadas pelas DC, presumivelmente devido a interacções electroestáticas entre a carga negativa da superfície celular e a carga positiva dos lipossomas.⁶⁰ Este efeito observa-se mesmo na presença de proteína do soro, as quais já foram caracterizadas por adsorverem à superfície deste tipo de partículas e modificarem as características da sua superfície. Proteínas específicas do soro, tais como as IgG, factores do complemento e fibronectina facilitam o reconhecimento e fagocitose dos lipossomas pelas APC através da adsorção a estas partículas, provocando uma mudança do potencial zeta das partículas positivas para negativas. No entanto, é posta a hipótese de que apesar da alteração na carga total, a superfície inicialmente positiva será um despoletador muito forte da acção das DC, sendo mesmo superior à opsonização.⁶¹

Nos macrófagos a tendência é os lipossomas com carga negativa, (com fosfolípidos de carga negativa fosfatidilserina (PS) e fosfatidilglicerol (PG)), serem os mais eficientes na entrega do seu conteúdo em relação aos lipossomas neutros. Nos macrófagos observa-se também que lipossomas de diâmetro reduzido (0,05-0,1µm) são preferencialmente endocitados.²⁸ No entanto, existem estudos que apontam os lipossomas positivos contendo esterilamina (SA) e com tamanhos superiores como sendo mais eficazmente capturados pelos macrófagos.⁶²

A opsonização de lipossomas pelas proteínas do plasma, desempenha um papel crítico na eliminação destas partículas, quando na corrente sistêmica. Assim que os lipossomas são expostos ao soro e plasma sanguíneo, adsorvem a uma vasta gama de proteínas, o que já foi demonstrado *in vivo* e *in vitro*.

As proteínas que opsonizam os lipossomas podem ser divididas em opsoninas imunitárias e não imunitárias. As opsoninas classificadas como imunitárias são proteínas do complemento e imunoglobulinas, que reconhecem os lipossomas e os marcam como partículas invasoras a serem fagocitadas pelo SMF. As opsoninas não imunitárias funcionam como ligandos, dirigindo os lipossomas a receptores específicos expressos nas células do SMF. Entre estas encontra-se a albumina, fibronectina, α2-macroglobulina e apolipoproteínas⁵⁸

1.3.1.2 Tipos de resposta imune

Os lipossomas catiónicos apresentam uma indução de linfócitos T citotóxicos e produção de anticorpos superior à provocada por lipossomas neutros ou negativos.³⁶ A capacidade fusogénica dos lipossomas encapsulando antígeno proteico é semelhante à dos lipossomas complexados com DNA, indicando um mesmo princípio de entrega no citosol, escapando à degradação endossomal e privilegiando a imunidade celular.

Os lipossomas carregados negativamente encapsulando o antígeno também dirigem a resposta imune no sentido Th1. O mesmo não se verifica quando os lipossomas vazios são administrados com o antígeno.³⁶

Estudos com ovalbumina, como antígeno modelo encapsulada em lipossomas, provocaram uma resposta imunitária maioritariamente do tipo Th1 independentemente da carga dos lipossomas, quando administrados subcutaneamente. A adição de um imunomodulador PGM fez reverter a resposta para uma do tipo Th2.

Em suma, apesar da influência que a carga dos lipossomas pode ter na sua função adjuvante ser ainda ambígua, existem algumas indicações de que os lipossomas carregados são mais eficazes que os neutros e que por sua vez os lipossomas carregados positivamente são melhores do que os negativos, na indução das resposta imune celular.

No entanto, devido à ambiguidade de resultados, opiniões divergentes apoiam a teoria de que a eficiência de encapsulação e o grau de fusogenicidade é que são os verdadeiros responsáveis pelo tipo de resposta, humoral ou celular e não a carga dos lipossomas.³⁶

1.3.1.3 Lipossomas e a mucosa nasal

Quando se trata de direccionar antígenos a células do epitélio, as partículas têm que assumir proporções na escala nano, aumentando o seu potencial para serem absorvidas.

O mecanismo exacto de transporte de lipossomas, em administrações nasais, ainda não está bem esclarecido, pois estes sistemas activam uma cascata de respostas imunológicas bastante complexa. No entanto, e uma vez que a imunidade das mucosas se desenrola na zona indutiva do tecido linfóide, é lícito considerar que os lipossomas facilitam a entrega de antígeno no NALT onde são capturados pelas APC, melhorando a magnitude da resposta imune.³⁰

Uma vez que o epitélio nasal é composto por um tecido fino pseudoestratificado, de células epiteliais ligadas por *tight junctions*, torna-se praticamente impossível admitir que os lipossomas atravessem pela via paracelular. O transporte transcelular torna-se assim a via mais provável de os lipossomas alcançarem o NALT.

A superfície apical das células epiteliais nasais não está desenhada de modo a facilitar a aderência, devido à presença de microvili e de uma camada espessa de muco. Pelo contrário, a superfície apical das células M tem domínios de microvili mais

reduzidos encontrando-se a descoberto grande parte da membrana celular. Deste modo, as células M podem internalizar partículas através de vários mecanismos, como a endocitose mediada por clatrina, pinocitose e fagocitose dependente de actina. Após internalização, as células M são capazes de transportar o lipossoma até as APC no lado basal por transcitose.³⁰

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

A fosfatidilcolina de ovo proveio da Lipoid (Alemanha). O fosfatidilglicerol de ovo foi adquirido à Avanti Polar Lipids (USA). Colesterol e Esterilamina foram comprados à Sigma (USA).

O quitosano de baixo (MM=150 kDa), médio (MM=400kDa) e elevado peso molecular (MM=600kDa) foram comprados à Fluka (EUA). O kit do ácido bicinconínico (BCA) de quantificação de proteína foi adquirido à Sigma Aldrich (EUA). Os géis de SDS-PAGE NuPAGE 10% Bis-Tris, MES SDS Running Buffer e SimplyBlue SafeStain foram comprados à da Invitrogen (Reino Unido). O gel Sephadex G-200 foi obtido da GE Healthcare (EUA) e preparado de acordo com as instruções do fabricante.

Os restantes reagentes e solventes utilizados são de grau analítico.

2.2 Animais

15 fêmeas murganhos BALB/c com 6-8 semanas de idade, divididas em 3 grupos, foram compradas ao Instituto Gulbenkian da Ciência (Oeiras, Portugal). Os animais foram providos de água e comida *ad libitum*. As actividades experimentais foram conduzidas de acordo com a Directiva de 24 de Novembro (nº 86/609 EEC), e legislação portuguesa Decreto-Lei nº 129/92, de 6 de Julho e a Portaria nº 1005/92, de 23 de Outubro.

2.3 Preparação de lipossomas

Nas diferentes formulações, o processo de preparação de lipossomas manteve-se constante, fazendo-se variar apenas as razões molares e concentrações lipídicas iniciais. Deste modo, os lípidos foram dissolvidos em clorofórmio, obtendo-se um filme lipídico por evaporação e rotação (Rotavapor RE-111, Büchi, Suíça). Os filmes lipídicos assim obtidos foram mantidos sob um fluxo de azoto para garantir secagem completa. De

seguida, os filmes foram hidratados com a solução aquosa da proteína que se desejava encapsular, obtendo-se vesículas multilamelares (MLV) através de agitação manual com ajuda de algumas esferas de vidro.

Dividiu-se a suspensão lipossomal por frascos de liofilização, a qual foi congelada a -70°C e posteriormente liofilizada (Liofilizador Edwards, Alemanha) durante a noite.

O liofilizado foi hidratado com tampão de citratos 10 mM em NaCl 0,145 M, pH=5,6, inicialmente com um décimo do volume, com agitação vigorosa. Após 30 minutos foi adicionado novamente o mesmo tampão para o volume final desejado. De seguida, as vesículas foram dimensionadas através do processo de extrusão (Extruder Lipex Biomembranes, Canadá) por filtros com diâmetro de poro decrescente de 0,8; 0,4; 0,2 μm (Nucleopore, E.U.A.). A proteína não encapsulada foi separada por ultracentrifugação (Ultracentrifuga – L8-60 M, Beckman Instruments, E.U.A.) a 300 000 xg, a 10°C , num rotor tipo 70Ti (Beckman Instruments, E.U.A.) após diluição em tampão de citratos 10 mM em NaCl 0,145 M, pH=5,6. Ressuspendeu-se o sedimento para o volume inicial no mesmo tampão.

Na preparação dos lipossomas para a vacinação fez-se um filme lipídico único para as duas administrações. Este filme foi hidratado com a solução de proteína, formando MLV, dividida em 14 amostras e liofilizada como descrito anteriormente. Neste caso, a proteína encontrava-se em tampão fosfatos em vez de água. Os frascos contendo o liofilizado foram acondicionado a 4°C , e as formulações a administrar foram preparadas nos dias anteriores à vacinação e reforço respectivamente. Após dimensionamento dos lipossomas, procedeu-se ao passo de separação da proteína não incorporada por ultra-centrifugação ressuspendendo o precipitado no mínimo de volume final possível. Depois de doseada o conteúdo em proteína e lípido, as formulações foram diluídas para a dose desejada. Foram igualmente preparadas formulações lipossomais, nas mesmas condições, mas sem proteína, mantendo a concentração lipídica.

2.4 Caracterização dos lipossomas

2.4.1 Doseamento da proteína

Neste trabalho foram usados dois métodos de quantificação de proteína: Lowry modificado e método do ácido bicinchonínico (BCA)⁶³.

O método de Lowry consistiu em determinar a quantidade de proteína encapsulada através do método de Lowry⁶⁴ após ruptura dos lipossomas com Triton X-100 e SDS.⁶⁵ Alíquotas da suspensão lipossomal foram colocadas em tubos de ensaio e diluídas com água para um volume final de 0,5 ml. Adicionou-se 0,4 ml de SDS 20%, 0,5 ml de Triton X – 100 e 0,1 ml de NaOH 1N. Após agitação os tubos foram levados a um banho a 60 °C até se observar uma solução completamente límpida (cerca de 15 minutos).

Após arrefecimento à temperatura ambiente adicionou-se 1 ml de reagente de Lowry, agitou-se e esperou-se 10 minutos. Adicionaram-se 0,100 ml de reagente de Folin na proporção de 1:1, agitaram-se os tubos e esperou-se 45 minutos. Leram-se as absorvências (UV-mini, Shimadzu) a 750 nm.

Na quantificação de proteína encapsulada o método do BCA sofreu algumas alterações, sendo o tampão de diluição substituído pela mistura usada na lise dos lipossomas no método de Lowry. Deste modo, as diluições sucessivas foram efectuadas em microplaca de 96 poços, na proporção de 1:1 com uma solução contendo SDS 8%, NaOH 0,1N e Triton 1%, nas respectivas proporções de 4:1:5. As placas foram incubadas a 37°C, durante uma hora. Este método baseia-se na redução do ião Cu^{2+} pelas proteínas em meio alcalino. O ião Cu^+ reage com o ácido bicinchonínico formando um produto de cor roxa. As absorvências foram determinadas a 565 nm. O padrão utilizado neste ensaio de quantificação foi a proteína albumina de soro bovino. O mesmo processo se aplicou no ensaio do MicroBCA.

2.4.2 Doseamento do lípido

A quantificação de fosfolípidos presentes nas formulações lipossomais realizou-se pelo método de Rouser⁶⁶ que se baseia na determinação colorimétrica do fosfato inorgânico. Alíquotas da suspensão lipossomal foram colocadas em tubos de ensaio e

secas num banho a 170°C. Adicionou-se 0,3 ml de ácido perclórico a 70% a cada tubo e aqueceu-se a 170°C, até todo o fosfato se encontrar na forma inorgânica (cerca de 45 minutos). De seguida adicionou-se 1 ml de água destilada, 0,4 ml de molibdato de amónio 1,25% e 0,4 ml de ácido ascórbico a 5%. Após agitação os tubos foram levados a 100°C, durante 5 minutos. As leituras de absorvência (UV-mini 1240, Shimadzu) foram efectuadas a 797nm.

Nas situações em que a formulação lipossomal se encontrava em tampão PBS a quantificação dos fosfolípidos foi feita com um kit de quantificação de fosfolípidos (Sprinreact, Espanha) uma vez que o fosfato presente no tampão interfere com o método de Rouser. Procedeu-se de acordo com as instruções do fabricante.

2.4.3 Determinação do potencial zeta

A carga superficial dos lipossomas foi determinada através da medição do potencial zeta num *Zetasizer 2000* (Malvern Instruments, Reino Unido). O potencial zeta é determinado a partir do movimento das partículas com laser de *Doppler*, sujeitas a electroforese determinando após diluição da formulação lipossomas em água filtrada (0,2 µm). Os resultados foram obtidos a partir da média de 3 medições.

2.4.4 Determinação do diâmetro médio

As determinações foram feitas por espectrometria de correlação fotónica no Zetasizer, modelo Nano S (Malvern Instruments, Reino Unido). Os resultados foram obtidos a partir da média de 3 medições, que por sua vez correspondiam a conjuntos de 10 a 17 leituras individuais.

O índice de polidispersão (PDI) foi usado como medida de distribuição de tamanhos. O PDI pode variar entre 0 (monodisperso) e 1,0 (polidisperso).

2.5 Estudo de perfil de eluição em coluna Sephadex G-200

Empacotaram-se dois tipos de coluna com gel Sephadex G-200 hidratado em tampão citratos, uma com 10 ml de volume e outra com 20 ml. Nestas colunas foram

aplicados 3 tipos de amostra: lipossomas vazios+extracto enzimático; lipossomas vazios; extracto enzimático; com o mesmo nível de diluições.

Na coluna de 10 ml aplicaram-se amostras de 0,3 ml e recolheram-se amostras a cada 0,5 ml de eluido. Na coluna de 20 ml aplicaram-se amostras de 1 ml e recolheram-se amostras a cada 0,5 ml de eluído.

Traçou-se o perfil de eluição a partir da quantificação de proteína e através da leitura de absorvências a 450 nm correspondente à turbidez inerente à formulação lipossomal localizando a presença dos lipossomas vazios.

Verificou-se a influência de diferentes tampões no perfil de eluição fazendo variar o meio em que se encontrava equilibrada a coluna.

Foram considerados como não detectáveis os valores de absorvência inferiores aos valores de absorvência de *branco* + $\frac{1^{\circ}\text{Padrão-branco}}{2}$.

2.6 Estudos de estabilidade

Foi estudada a estabilidade da formulação lipossomal de antigénios de *S. equi* a 4°C durante 72h e à temperatura ambiente ao longo de 24h.

Recolheram-se 3 alíquotas de 0,3 mL nos tempos t=0, 18, 24, 48 e 72h no estudo a 4°C, e nos tempos t=0; 2,5; 5 e 24h no estudo à temperatura ambiente. De seguida os lipossomas foram separados da proteína não encapsulada por cromatografia de exclusão molecular em coluna com gel Sephadex G-200.

A estabilidade dos lipossomas foi avaliada através da quantificação da proteína e lípido presentes na fracção lipossomal em relação ao tempo 0, assim como a evolução do diâmetro médio das partículas. A estabilidade estrutural dos antigénios foi avaliada através de SDS-PAGE com coloração com nitrato de prata (Sigma, R.U.).

2.7 Estudo do perfil de libertação

A formulação lipossomal contendo antigénios de *S. equi* em tampão citratos 10 mM em NaCl 0,145 M, pH=5,6, foi diluída para metade em tampão fosfato salino (PBS) 10mM (2x) pH=7,4 com azeto de sódio a 0,02%. Após diluição, o pH da mistura

encontrava-se na gama de pH 6,5-7,5. As amostras foram divididas em tubos eppendorfs de 1 mL e colocada sob agitação orbital num Diffutest a 37°C.

Recolheram-se amostras em triplicado a vários tempos ($t=0$, 24, 48, 72, 168, 336, 504, 672, 1008h) que se centrifugaram a 30000 xg, a 5°C durante 3h. Quantificou-se a proteína através do ensaio Micro BCA™ e o lípido (método acima descrito) presentes no precipitado. Determinou-se o diâmetro médio das partículas ao longo do tempo de ensaio.

2.8 Revestimento de lipossomas com quitosano

Estudou-se o revestimento de lipossomas vazios com carga superficial negativa com soluções de quitosano de diferentes massas moleculares (MM=150, 400 e 600 kDa), a diferentes temperaturas -4°C, T_{ambiente} , e 37°C.

As soluções de quitosano foram preparadas por dissolução em água e adição de 1% (v/v) de ácido acético e depois incubadas com os lipossomas numa razão de 1:1. Lipossomas não revestidos foram diluídos na mesma razão em tampão de citratos.

Após incubação, as amostras foram centrifugadas a 30000 xg durante 15 minutos a 4°C. Ressuspendeu-se o precipitado para o volume inicial, mediu-se o potencial zeta e quantificou-se o quitosano adsorvido aos lipossomas e o quitosano presente no sobrenadante.

2.8.1 Quantificação do quitosano adsorvido aos lipossomas

A quantificação do quitosano foi realizada segundo o protocolo descrito por Muzzarelli⁶⁷, com adaptação a microplaca de 96 poços. As amostras são sucessivamente diluídas em tampão de hidrocloreto de glicina, pH=3,2 adicionando-se depois uma solução corante a 150 mg/ml a cada poço. A reacção tem por base a complexação dos grupos amina protonados do quitosano com o *Cibracon brilliant red*, um corante aniónico. Realizaram-se leituras das amostras a 575 nm.

Determinou-se a concentração de quitosano por comparação com uma recta de calibração de quantidades de quitosano conhecidas.

2.9 Extracção de antígenos de *S. equi*

A extracção de antígenos decorreu de acordo com um protocolo já descrito por Florindo *et al* (2009)²⁴ com algumas alterações. Deste modo, células de *S. equi* inactivadas (estirpe LEX, ATCC 53186) em tampão fosfato 50 mM, pH=6 foram sujeitas a 3 períodos de sonicação de 5 minutos cada. Adicionaram-se às células assim homogeneizadas 0,75g Lisozima, 5KU Mutanolisina e 12,8g de Sacarose por cada 30g de células e deixou-se a incubar durante a noite a 37°C sob agitação orbital. Protoplastos e células não lisadas foram removidas por centrifugação, primeiramente a 5000 xg e de seguida a 30000 xg.

Procedeu-se depois a uma ultrafiltração em membrana com exclusão molecular de 30 KDa, lavando-se o extracto com 3 volumes de tampão fosfatos pH=6,0, de modo a remover resíduos de sacarose e lisozima. Como determinado anteriormente por Florindo *et al* (2009)²⁴ a percentagem de SeM corresponde a 2,7% da concentração de proteínas total.

2.10 Estudo da integridade dos antígenos através de SDS-PAGE e Western Blotting

A integridade estrutural de cada um dos antígenos presentes no extracto enzimático, após extracção de células *S. equi* e encapsulação em lipossomas, foi avaliada por SDS-PAGE através da comparação com marcadores moleculares pré-corados de baixo peso molecular (Invitrogen, R.U.) e proteínas do extracto enzimático nativas. As amostras foram aplicadas num gel de poliacrilamida a 10% (m/v) (Invitrogen, R.U.) e corridas à voltagem constante de 200V durante 45 minutos. Após migração das bandas o gel foi corado com solução SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen, R.U.).

No estudo de estabilidade devido às reduzidas quantidade de proteína a coloração foi efectuada com nitrato de prata de acordo com Blum *et al* (1987)⁶⁸.

A imunogenicidade dos antígenos após extracção enzimática e após encapsulação foi avaliada através de Imunotransferência (*Western Blotting*). Após separação dos vários antígenos em função da razão carga/massa através de SDS-PAGE estes foram transferidos para uma membrana de PDVF num sistema semi-seco

(Amersham, GE Healthcare). A membrana foi seguidamente bloqueada com uma solução de 5% de leite desnatado (m/v) em tampão fosfato salino com 0.05% (v/v) de Tween 20 TPBS (tampão de bloqueamento) durante 90 minutos sob agitação, à temperatura ambiente. De seguida incubou-se a membrana durante 2h com o soro de cavalo recuperado de gurma diluído em tampão de bloqueamento (1:100), sob agitação constante. Após incubação a membrana foi lavada em 3 vezes durante 5 minutos com TPBS e colocada sob incubação com o anticorpo secundário anti-IgG de cavalo conjugado com fosfatase alcalina, produzido em coelho, diluído 1000x em tampão de bloqueamento.

Após 2h de incubação procedeu-se a nova lavagem da membrana em 3 períodos de 5 minutos cada com TPBS. A imunogeneidade dos antígenos foi depois avaliada colorimetricamente através da reacção com o kit Sigma Fast BCIP/NBT (Sigma, R.U.).

2.11 Estudos de imunização

Três grupos de murganhos fêmeas BALB/c foram imunizados pela via intranasal com 25 µl de formulação contendo 10 µg de proteína SeM em cada narina no dia 0 e receberam reforço ao dia 21, aplicados com uma micropipeta. O primeiro grupo recebeu a formulação de lipossomas encapsulando o extracto enzimático, o segundo grupo foi vacinado com lipossomas vazios e o terceiro grupo recebeu PBS.

As formulações foram preparadas com tampão de fosfatos 50mM a pH=6, sendo que após liofilização foram ressuspensas em tampão citratos.

No dia 114 após vacinação os animais foram eticamente sacrificados por deslocamento cervical após anestesia, recolhendo-se os baços e pulmões em ambiente asséptico.

2.12 Recolha de amostras

Recolheram-se amostras de sangue a partir da veia da cauda a cada 15 dias após a primeira imunização. Deixou-se o sangue coagular durante a noite a 4°C e separou-se

o soro por centrifugação, a 18000 xg, durante 5 minutos a 4°C. Os soros recolhidos foram acondicionados a -20°C até serem analisados pelo método indirecto de ELISA.

Na impossibilidade de efectuar lavagens aos pulmões, devido ao seu tamanho reduzido, estes foram retirados juntamente com a traqueia, mergulhados em 5 ml de solução de lavagem com inibidor de proteases (PMSF 1mM, cloreto de sódio 0,9% (m/v), 0,5% (v/v) Tween 20) e acondicionados a -70°C até posterior utilização.

De modo a libertar as proteínas os pulmões foram submetidos a 3 períodos de sonicação, de 30s cada, e centrifugados a 20 000 xg, durante 30 minutos, a 4°C. Os sobrenadantes foram depois recolhidos e novamente centrifugados de modo a obter uma amostra límpida. As lavagens pulmonares foram concentradas através de liofilização após congelação. O liofilizado foi re-hidratado com 500 µl de água purificada esterilizada imediatamente antes da quantificação das IgA por ELISA.

2.13 Cultura de esplenócitos

Os baços foram recolhidos em meio asséptico para tubos contendo meio base RPMI (Gibco, R.U.). Após lavagem em meio base RPMI os baços foram transferidos para meio completo RPMI (meio de cultura RPMI suplementado com 10% Soro bovino fetal (FBS), 20mM L-gultamina, 10⁵ U/l de penicilina e 100mg/l de estreptomicina) e dispersos com o auxílio de duas agulhas. Centrifugou-se a suspensão celular a 200 xg durante 10 minutos e ressuspendeu-se o sedimento celular em meio RPMI completo realizando-se nova centrifugação. Contaram-se as células num hemocitómetro, diluídas em azul de tripano, e ajustou-se a concentração para 2X10⁶ células/100µL em meio RPMI completo. Adicionou-se 100 µl de células a cada um dos poços de uma placa de cultura de células (Greiner, Alemanha) contendo 100 µl de meio RPMI completo e a outra placa com 100 µl de RPMI completo e 5µg/mL de antigénio. Deixaram-se as placas numa incubadora com 5% (v/v) CO₂ durante 72h, a 37°C. O sobrenadante foi recolhido e guardado a -80°C até análise das diferentes citocinas.

As citocinas IL-2, IL-4, IL-6 e IFN-γ foram quantificadas com os Kits Mouse IL-2 ELISA Kit, Mouse IL-4 ELISA Kit, Mouse IL-6 ELISA Kit e Mouse IFN-γ ELISA Kit (RayBiotech, EUA).

2.14 Quantificação da resposta imune sistêmica e mucosal

Microplacas de 96 poços de ELISA (Microolon®, Greiner bio-one, Alemanha) foram incubadas com 100 µl de tampão de carbonato (pH=9,6) com 5µg/ml de extracto enzimático SeM durante a noite a 4°C. Após lavagem com 300 µl de uma solução 0,05% (v/v) de Tween 20 em PBS, pH=7,4 (TPBS) as microplacas foram incubadas com 250 µl uma solução a 5% (m/v) de leite desnatado em TPBS, durante 1h, a 37°C. As microplacas foram novamente lavadas com TPBS e as amostras de soro foram distribuídas pelos poços e sucessivamente diluídas na solução de 5% (m/v) de leite desnatado. Após 90 minutos de incubação a 37°C lavaram-se as placas com TPBS 3 vezes e adicionaram-se os 100 µl dos anticorpos secundários produzidos em cabra anti imunoglobulinas específicos de murganho conjugado com peroxidase de rábano (anti-IgG (Serotec, UK) diluído 1:1000, anti-IgG1 (Serotec, UK), anti-IgG2a (Serotec, UK) e anti-IgA (Serotec, UK) diluídos 1:2000). As placas foram novamente incubadas a 37°C durante 90 minutos repetindo-se o passo de lavagem 3 vezes após incubação. Adicionou-se 100 µl do substrato da enzima peroxidase seguindo as instruções do o Kit SigmaFAST™ OPD Kit (Sigma-Aldrich, EUA), as placas foram incubadas no escuro durante 15min a 37°C. A reacção foi terminada com a adição de 50 µl de solução de H₂SO₄ 2.25N, lendo-se a absorvência a 490nm.

A resposta imune foi avaliada através dos títulos das imunoglobulinas específicas IgG, IgG1, IgG2a e IgA, que foi definido como a média do recíproco da diluição à qual a absorvência a 490nm era 5% superior à do controlo negativo mais elevado.

2.15 Análise estatística

Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão. Os resultados de experimentação animal são apresentados como média \pm SEM. A análise estatística foi feita com o teste não paramétrico Mann-Whitney e a significância foi definida para *p-value* <0,05.

Equação 2.8.1.1 - Eficácia de encapsulação/incorporação

$$E. E(\%) = \left(\frac{[\text{proteína}]_{\text{final}}}{[\text{lípidio}]_{\text{final}}} \bigg/ \frac{[\text{proteína}]_{\text{inicial}}}{[\text{lípidio}]_{\text{inicial}}} \right) \times 100$$

Equação 2.8.1.2 – Cálculo do rendimento

$$\text{Rendimento de X} = \frac{[\text{X}]_f}{[\text{X}]_i} \times 100$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Otimização da formulação

3.1.1 Variações na eficiência de encapsulação usando BSA como proteína modelo

O desenvolvimento de um vector de transporte de proteínas é altamente dependente da redução ou prevenção da degradação química, desnaturação e agregação das mesmas de modo a preservar a sua função. Por outro lado, a reduzida imunogenicidade dos antígenos de *S. equi* na sua forma solúvel faz aumentar a necessidade de um vector de transporte com as características dos lipossomas, que actuam ao mesmo tempo como adjuvantes.^{69,70}

De entre as várias características que influenciam a interacção das partículas com o tecido das mucosas e a forma como são capturadas, como sendo a composição lipídica, via de administração e capacidade de incorporação, o tamanho desempenha um papel crucial.

Para que os lipossomas possam ser usados em vacinas é também necessário que a técnica de preparação seja simples, reprodutível e que as vesículas exibam uma baixa distribuição de tamanhos.⁷¹

O método de desidratação – reidratação desenrola-se sob condições não agressivas, como seria o caso da presença de solventes orgânicos ou detergentes. Este é o método de eleição na encapsulação de proteínas pois uma vez que se desenrola em condições não agressivas protege as proteínas e possibilita eficácias de encapsulação (E.E.) bastante elevadas. O passo de liofilização leva a que as pequenas vesículas vazias formadas se quebrem e ocorra a concentração das proteínas junto das bicamadas lipídicas, facilitando a sua associação e possibilitando também a fusão de vesículas mais pequenas.⁷² Deste modo, verifica-se eficácias de incorporação de proteína superiores em relação a outros métodos.⁷³ No entanto, este método só é vantajoso na encapsulação de proteínas que sejam resistentes à congelação.

O método de extrusão de DRV foi descrito como sendo o mais proveitoso nas eficiências de encapsulação de proteínas hidrófilas, não apresentando as mesmas desvantagens da sonicação, processo que causa a desnaturação das proteínas.⁷³ No entanto, este processo de dimensionamento ao fazer com que os lipossomas se quebrem leva a que a proteína que se encontra no interior escape para o exterior, diminuindo dessa forma a E.E..

Um dos maiores desafios na encapsulação de proteínas em lipossomas é a sua encapsulação em quantidades suficientes, de maneira a provocar efeitos farmacológicos sustentados e reprodutíveis.⁷⁴ Neste sentido, e tendo em conta a necessidade de um equilíbrio entre os benefícios e desvantagens de cada método, a encapsulação de proteína por desidratação – reidratação, seguido de dimensionamento por extrusão, foi o método escolhido na preparação dos lipossomas neste trabalho.

Apesar de existirem inúmeros estudos sobre o uso de lipossomas como adjuvantes, torna-se difícil tirar conclusões definitivas quanto à influência das características físico-químicas na sua acção adjuvante, uma vez que foram utilizadas variadas composições químicas e antigénios diferentes. Por outro lado, uma vez que a superfície lipossomal é proporcional à concentração lipídica e que por seu lado, o volume interno é proporcional a raiz cúbica dessa concentração⁷⁵ há uma necessidade de atingir um compromisso entre estes dois parâmetros.

De modo a perceber qual a formulação lipídica que proporcionaria uma maior eficiência, foram estudadas algumas variações da composição lipídica, e a albumina sérica bovina (BSA) foi escolhida como proteína modelo no estudo preliminar da E.E..

Para o efeito prepararam-se quatro formulações com razões e composições lipídicas diferentes, como especificado no Quadro 3.1.1.1, com concentrações iniciais de BSA crescentes de 0,5, 1, 2, 5, 10, 20 mg/ml.

Neste estudo, observou-se a influência da carga nas E.E., fazendo variar a carga lipídica total através da adição de lípidos negativos como a fosfatidilglicina (PG) e de lípidos positivos, no caso, a esterilamina (SA).

Quadro 3.1.1.1 – Diferentes razões molares e composições lipídicas estudadas

Designação	Composição lipídica	Razões molares	Concentração lipídica (μmol/ml)
A	PC:Chol	2:1	20
B	PC:Chol	4:1	20
C	PC:Chol:PG	7:3:1	40
D	PC:Chol:SA	7:3:1	40

Após separação da proteína não encapsulada através de centrifugação, foi possível determinar o rendimento em lípido e proteína para cada formulação, assim como as E.E.. A eficácia de encapsulação foi definida como a razão proteína/lípido final sobre a razão proteína/lípido inicial.

Equação 2.8.1.1 - Eficácia de encapsulação/incorporação

Como se pode ver na figura 3.1.1.1 o aumento da razão proteína/lípido inicial levou ao aumento da razão proteína/lípido final, o que se traduz na estabilização das E.E. No entanto, este efeito não é linear para razões de proteína/lípido iniciais mais elevados, indicando que o máximo de E.E. foi atingindo.

Por outro lado, observa-se que as E.E. variam de acordo com a composição lipídica e razões molares, registando-se especiais alterações nas E.E. dos lipossomas com cargas positivas e negativas.

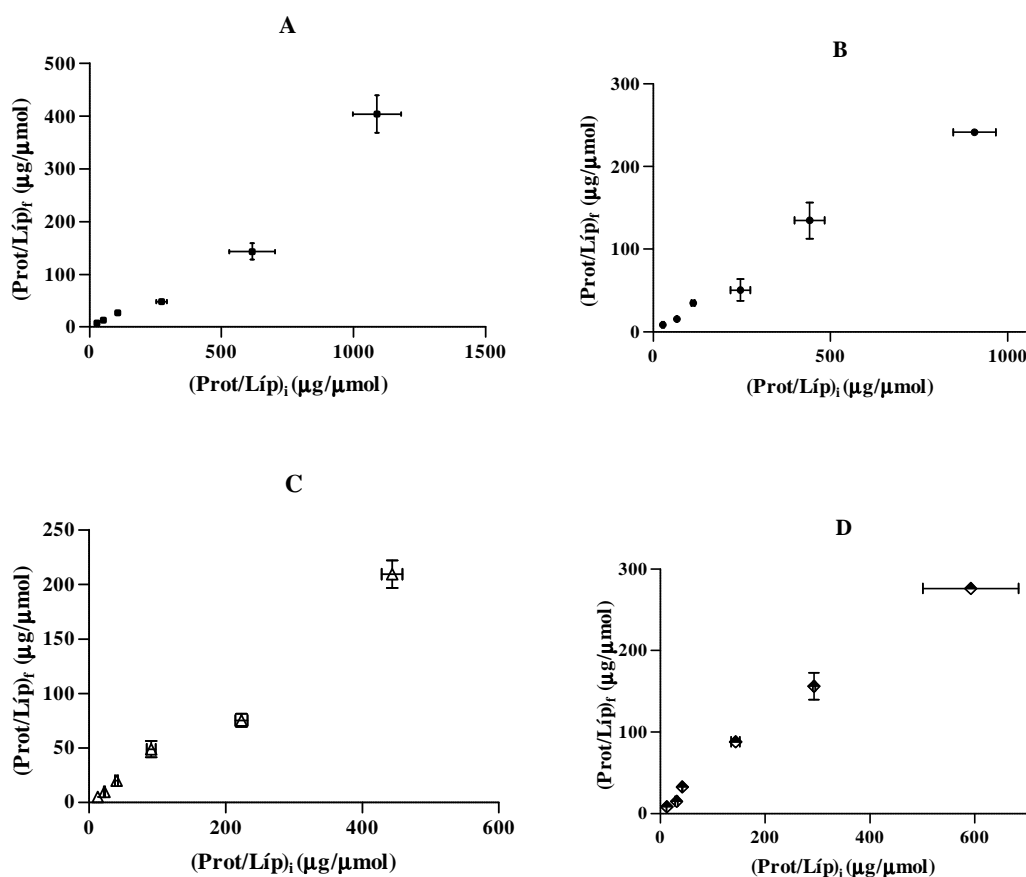


Figura 3.1.1.1 – Efeito da razão proteína/lípido inicial sobre a razão proteína/lípido final nas diferentes formulações lipídicas estudadas (A, B, C e D).

Neste sentido pode-se concluir que as E.E. não vão aumentar para concentrações de proteína inicial elevadas, e que por outro lado as formulações carregadas são as mais indicadas na encapsulação de proteínas.

Em circulação os lipossomas neutros apresentam reduzida ligação induzida por cargas a componentes do plasma, não obstante a adsorção devido às forças de van der Waals. No entanto, os lipossomas não carregados exibem também uma menor estabilidade em sistemas coloidais em relação a formulações que apresentam cargas.⁵⁶

Neste estudo, observou-se que as formulações neutras (A e B) apresentam as eficiências de encapsulação mais baixas, o que está de acordo com dados da literatura, onde para diferentes razões molares se obtêm E.E. da BSA na ordem dos 30%.^{76,77}

Por outro lado, estes resultados exprimem níveis de encapsulação superiores para formulações carregadas, o que vai de encontro a resultados anteriores.⁷³

Os lipossomas carregados negativamente apresentam E.E. na ordem dos 50% que estão de acordo com valores encontrados na literatura.⁷⁸

A formulação lipossomal com carga positiva demonstra uma eficácia de encapsulação ligeiramente superior às formulações com carga negativa e bastante superior às formulações neutras. Tendo em conta que o pI da BSA é 5,3, com o tampão de citratos 10 mM em NaCl 0,145 M, pH=5,6, a proteína assumirá uma carga negativa registando-se assim uma maior interacção com o lipossomas carregados positivamente.

É também necessário ter em atenção que a escolha da força iónica do tampão pode influenciar os níveis de E.E.. Os iões podem actuar como agentes protectores dos grupos carregados, levando à redução das interacções electrostáticas entre aminoácidos presentes na superfície das proteínas e os fosfolípidos, o que está de acordo com a teoria de Debye-Huckel.⁷⁵ No entanto, para administração existe um limite de força iónica associada à osmolaridade, que nas mucosas assume um valor de 300 mOsm. Neste sentido, é necessário existir um equilíbrio entre estes dois factores, o que acaba por ter repercussões a nível das E.E..

Os resultados apresentados na figura 3.1.1.1 exprimem E.E. superiores para a formulação D sendo assim um ponto de partida para a encapsulação dos antígenos totais de *S.equi*. De facto, a pH neutro a camada mucosa encontra-se negativamente

carregada, pelo que partículas com carga positiva terão maior probabilidade de interação com o muco aumentando a sua absorção neste local.⁷⁹

A escolha do diâmetro tem que ser um compromisso entre a capacidade de incorporação do antigénio, que aumenta como tamanho das vesículas, a estabilidade dos lipossomas que diminui com o aumento do tamanho (sendo o tamanho óptimo entre 80-200nm), e a possibilidade de serem fagocitadas pelas APC's.⁵⁶ A variedade de tamanhos que podem ser fagocitados pelas APCs é imensa. No entanto, observou-se que partículas com um diâmetro inferior a 500 nm podem provocar uma resposta imune superior à obtida com transportadores de maior tamanho.⁸⁰ Por outro lado, as partículas na escala dos nanómetros são também facilmente absorvidas pelas células constituintes do NALT.⁸¹

No entanto, existem registos de que nos macrófagos dos pulmões de ratinho o nível de internalização aumenta com o tamanho dos lipossomas, sendo o máximo atingido para lipossomas com 1000nm.⁸²

Na tentativa de conjugação de todos estes factores escolheu-se dimensionar os lipossomas a 200 nm, de modo a que se desse uma eficiente captura das partículas a nível das células M da mucosa nasal, assim como pelas APC.

Resultados e Discussão

Quadro 3.1.1.2 - Variação dos diâmetros médios dos lipossomas em função da concentração de proteína BSA inicial (0,5;1; 2; 5; 10 e 20 mg/ml) (média \pm S.D. ; n=3).

Diâmetro médio após extrusão (μm)	PDI	Diâmetro médio após centrifugação (μm)	PDI
Formulação A			
0,37 \pm 0,0081	0,52	0,49 \pm 0,038	0,088
0,37 \pm 0,0043	0,54	0,42 \pm 0,017	0,55
0,37 \pm 0,0027	0,55	0,39 \pm 0,011	0,54
0,35 \pm 0,0049	0,52	0,47 \pm 0,013	0,85
0,38 \pm 0,018	0,55	0,38 \pm 0,015	0,53
0,37 \pm 0,0068	0,57	0,42 \pm 0,011	0,60
Formulação B			
0,25 \pm 0,0014	0,34	0,26 \pm 0,0027	0,32
0,27 \pm 0,0048	0,36	0,28 \pm 0,0040	0,42
0,28 \pm 0,0010	0,42	0,30 \pm 0,0046	0,44
0,29 \pm 0,0014	0,43	0,30 \pm 0,0052	0,43
0,27 \pm 0,0035	0,40	0,28 \pm 0,0053	0,40
0,23 \pm 0,0056	0,20	0,24 \pm 0,0026	0,23
Formulação C			
0,18 \pm 0,0026	0,080	0,20 \pm 0,0010	0,20
0,18 \pm 0,0026	0,080	0,18 \pm 0,0012	0,12
0,18 \pm 0,0005	0,11	0,18 \pm 0,0013	0,085
0,21 \pm 0,0025	0,23	0,18 \pm 0,0010	0,099
0,27 \pm 0,002	0,25	0,18 \pm 0,0011	0,087
0,18 \pm 0,0023	0,15	0,21 \pm 0,0035	0,22
Formulação D			
0,20 \pm 0,0028	0,088	0,21 \pm 0,0044	0,12
0,19 \pm 0,0026	0,10	0,21 \pm 0,0067	0,056
0,18 \pm 0,0030	0,09	0,20 \pm 0,0075	0,070
0,19 \pm 0,0029	0,12	0,20 \pm 0,0093	0,099
0,17 \pm 0,0038	0,10	0,19 \pm 0,0075	0,065
0,17 \pm 0,0017	0,10	0,18 \pm 0,0060	0,078

Os resultados obtidos, que se encontram no quadro 3.1.1.2 indicam uma tendência de maior estabilidade no diâmetro médio das formulações de lipossomas carregados, sendo que para o mesmo número de extrusões apenas estes mantiveram o diâmetro desejado.

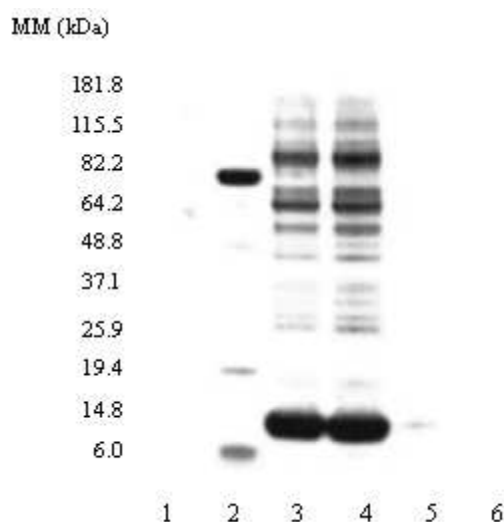
É possível também identificar um nível de polidispersão superior para as formulações neutras indicando que não se trata de uma população homogénea, indo de encontro às razões acima apresentadas para a mais fraca interacção entre a proteína e os lípidos não carregados. Um outro factor que poderá estar na causa desta população heterogénea será o fenómeno de agregação que se dará entre partículas neutras, e que poderá contribuir para a fusão entre essas mesmas partículas.

Da análise da evolução dos diâmetros médios, representados no quadro 3.1.1.2 resulta também a conclusão que os lipossomas não sofrem alteração a nível de tamanho após centrifugação, ou seja mantêm-se estáveis, pelo que este demonstra ser um método seguro na separação da proteína não incorporada nos lipossomas.

3.1.2 Caracterização do extracto enzimático usado nos estudos preliminares de E.E.

Nos estudos prévios de E.E. foi utilizado um extracto enzimático preparado a partir da digestão da parede celular de *S. equi* com lizosima e mutalosina. Uma vez que este extracto não se encontrava purificado dos enzimas usados na sua preparação, e também para promover a sua concentração, foi realizado um processo de diafiltração.

Após diafiltração realizou-se um SDS-PAGE, para verificar as condições do extracto que ficou concentrado, assim como identificar se a lizozima havia sido permeada.



ra 3.1.2.1 - Perfil electroforético do extracto nativo antes e após diafiltração Poços: 1 – adores moleculares, 2 – Proteína SeM nbinante, 3 – Extracto enzimático, 4 – ctio enzimático após diafiltração, 5 e 6 – eado da diafiltração

Como se pode verificar na figura 3.1.2.1 numa primeira diafiltração ocorreu a permeação de apenas uma proteína. A proteína encontrada no permeado pode-se identificar como sendo a lisozima, uma vez que a banda corresponde a uma massa molecular muito próxima da desta proteína que é 14.7 kDa.

Numa segunda diafiltração não se verifica a presença de qualquer proteína no permeado o que pode significar que ocorreu colmatagem da membrada de diafiltração, ou mesmo que o poro de membrana usado não é o mais aconselhável na separação da lisozima.

A banda intensa correspondente à lisozima que se apresentava no extracto enzimático inicial continua a verificar-se após diafiltração, o que indica que esta proteína encontrava-se em grande quantidade nos estudos preliminares de E.E..

3.1.3 Extracto enzimático em solução aquosa

Por razões económicas o método de Rouser, que se baseia na detecção colorimétrica do fosfato, é o método de quantificação de lípido mais utilizado em laboratório. Neste sentido, os estudos de eficiência de encapsulação foram conduzidos

com o extracto enzimático em solução aquosa de modo a não existirem interferências com a quantificação lipídica.

Uma vez que o extracto enzimático se encontra em tampão de fosfatos foi necessário realizar uma troca de solvente em coluna de troca de tampão PD-10 (gel Sephadex G-25, Ge Healthcare, EUA) que permite separar substâncias de elevada massa molecular ($M_r=5000$), neste caso as proteínas, de substâncias de baixa massa molecular ($M_r=1000$) como sendo os solutos dos tampões.

Deste modo, realizou-se um tratamento prévio da amostra, que consistiu em passá-la por uma coluna de Sephadex G-25PD10 equilibrada com água purificada (Milli Rx, EUA). O perfil de eluição em coluna foi traçado a partir da quantificação da proteína em cada fracção de 0,5 ml recolhida e encontra-se representado na figura seguinte.

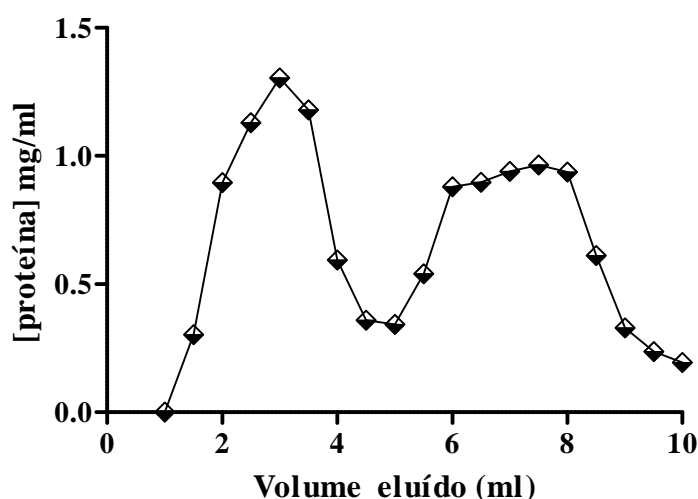


Figura 3.1.3.1 -Perfil de eluição do extracto enzimático livre em coluna PD10, equilibrada com água bidestilada.

Através da análise do perfil de eluição do extracto enzimático, observa-se a divisão destas proteínas em dois picos de eluição distintos. No primeiro pico (volume de eluição 1 a 5 mL) encontram-se as proteínas que serão usadas na encapsulação em lipossomas, no segundo pico (volume de eluição >5 mL) deverão encontrar-se péptidos que terão que ser descartadas neste estudo. O aparecimento do segundo pico terá

Resultados e Discussão

provavelmente origem na existência de péptidos a nível do extracto enzimático, que devido ao seu reduzido tamanho acabam por sair mais tarde no eluído.

De forma a perceber qual o rendimento da coluna em relação à proteína aplicada e recolhida, procedeu-se à quantificação de proteína recolhidos, referentes ao primeiro pico (Quadro 3.1.3.1). Nestes cálculos é necessário ter em conta que a fracção recolhida sofreu uma diluição de 1,75x, uma vez que para 2ml de extracto recolheram-se 3,5 ml de eluído.

Quadro 3.1.3.1 – Cálculo do rendimento da coluna PD-10 na eluição do extracto enzimático

[proteína] (mg/ml)	$0,88 \pm 0,04$
[proteína] _i (mg/ml)	2,5
Rendimento (%)	61 ± 3

A partir desta quantificação é possível afirmar que apenas 60% da proteína inicial foi usada nos estudos preliminares de E.E., sendo que os restantes 40% corresponderão aos péptidos de tamanhos reduzidos e também provavelmente a proteína que aglomere devido à falta de sais na coluna. Esta proteína ficará retida na coluna, não tendo sido quantificada.

3.1.4 Método de Lowry: água vs tampão

Visto que este extracto enzimático se trata de uma mistura de proteínas com características próprias, estudou-se o efeito de água e tampão citratos na diluição das amostras no método de Lowry de quantificação de proteína.

Quadro 3.1.4.1 – Comparação entre água e tampão citratos na quantificação de proteína pelo método de Lowry

	Água		Tampão Citratos	
	Extracto em água	Extracto original	Extracto em água	Extracto original
[prot] mg/ml	0,88 ± 0,04	2,54 ± 0,11	0,79 ± 0,02	2,17 ± 0,02

A comparação entre resultados revela não existirem diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os meios de diluição, pelo que se prosseguiu o estudo usando tampão citratos.

3.1.5 Validação método do método do BCA modificado

De modo a verificar a equivalência entre os dois métodos de quantificação de proteína o método do BCA modificado e de Lowry para quantificações de proteína encapsulada em lipossomas, procedeu-se a um estudo comparativo entre estes dois métodos.

Deste modo, quantificou-se a proteína presente nas fracções lipossomas iniciais e finais pelos dois métodos e calcularam-se as E.E..

Quadro 3.1.5.1 – Comparação entre métodos de quantificação de proteína

Método	Rendimento em proteína (%)	Rendimento em lípido (%)	E.E.(%)
Lowry	11 ± 1	36 ± 2	27 ± 7
BCA	12 ± 0,1		30 ± 1

Desta comparação resulta, como se pode ver no Quadro 3.1.5.1, que a concentração de proteína doseada pelos dois métodos é da mesma ordem de grandeza, podendo usar-se de forma equitativa qualquer um deles na determinação da proteína encapsulada em lipossomas.

3.1.6 Variação dos parâmetros de incorporação com a concentração de proteína inicial

Uma vez que cada proteína apresenta um comportamento diferente no que toca a E.E. em lipossomas, realizou-se um novo estudo, com os antígenos totais de *S. equi*. Tendo-se concluído no estudo com BSA que existia uma saturação das E.E. para concentrações de proteína mais elevadas, este estudo foi realizado apenas com concentrações de proteína reduzidas.

A composição lipídica corresponde à formulação D, que se espera formar lipossomas carregados positivamente de modo a interagir com as mucosas carregadas negativamente.

Quadro 3.1.6.1 – Quadro resumo da variação da eficácia de encapsulação em função da variação da concentração inicial de proteína

[Proteína] _i (mg/ml)	[Lípido] _i (μmol/ml)	(Prot/Lip) _i (μg/μmol)	(Prot/Lip) _f (μg/μmol)	Rendimento em lípido (%)	Rendimento em proteína (%)	E.E. (%)
2	40	72 ± 16	19 ± 1	36 ± 3	12 ± 0,01	27 ± 7
4		104 ± 4	27 ± 1	41 ± 0,4	11 ± 1	26 ± 2
6		129 ± 0,5	44 ± 3	35 ± 0,8	10 ± 0,4	34 ± 2

Como se pode verificar no Quadro 3.1.6.1 observa-se uma eficácia de encapsulação inferior para o extracto enzimático em relação à BSA o que se pode explicar tendo em conta que se trata de uma mistura de proteínas, entre as quais a lisozima. Neste caso, as diferentes proteínas deverão comportar-se de maneiras também diferentes, sendo que se pode presumir a existência de uma encapsulação selectiva em relação às proteínas que interagem com a bicamada lipídica de formas distintas. Esta mistura de antígeno é composta por macromoléculas com diferentes domínios e com capacidade de atingirem diferentes conformações após interacção com superfícies. Deste modo é necessário ter em conta a competição e interacção entre cargas, que dependem do pH e das interacções electrostáticas entre os diferentes tipos de proteína presentes no extracto enzimático e da própria interacção entre as proteínas e os lipídios.⁷⁵

Apesar de reduzidos estes níveis de E.E. vão de encontro a outros registados com proteínas que rondam os 35% para a anatoxina do tétano e da difetéria ⁸³ em lipossomas de PC:Chol.

Por outro lado, observa-se um baixo rendimento em proteína e lípido neste processo. O rendimento de proteína é comum a todas as concentrações de proteína iniciais, ou seja, apenas 10% da proteína inicial fica encapsulada nos lipossomas, sendo o restante separado no passo de centrifugação. No entanto, os valores de rendimento indicam grandes perdas de lípido que são um pouco anormais. Para colocar de parte a possibilidade de ser o extracto enzimático a causa de perdas tão elevadas replicou-se o estudo de E.E. com o enzima superóxido dismutase (SOD). Neste estudo continuam a verificar-se rendimentos de lípido muito reduzidos, encontrando-se valores de E.E. concordantes aos obtidos para a BSA nestas concentrações de proteína.

Quadro 3.1.6.2 – Estudo do efeito da natureza proteica nos parâmetros de encapsulação

[SOD] (mg/ml)	Rendimento Proteína (%)	Rendimento Lípido (%)	Eficiência de Encapsulação (%)
2	20 ± 1	37 ± 3	44 ± 6

Como já foi referido, para que os lipossomas possam ser usados em vacinas é necessário que exibam uma população homogénea com uma baixa distribuição de tamanhos.

A análise dos diâmetros médios permite-nos identificar uma população homogénea e com o tamanho desejado. Por outro lado, através da análise dos valores de potencial zeta, confirma-se que os lipossomas com proteína e vazios exibem uma carga positiva.(Quadro 3.1.6.3)

Resultados e Discussão

Quadro 3.1.6.3 – Evolução de diferenças entre diâmetros médios, PDI e potenciais zeta para diferentes concentrações de extracto enzimático. (n.d. = não determinado)

[proteína] mg/ml	Diâmetro médio (μm)	PDI	Potencial zeta
vazios	$0,21 \pm 0,009$	$<0,069$	$17,4 \pm 2,3$
2	$0,19 \pm 0,008$	$<0,094$	$17,5 \pm 1,1$
4	$0,18 \pm 0,003$	$<0,085$	n.d.
6	$0,19 \pm 0,001$	$<0,114$	n.d.

Tendo em vista a formulação a administrar em ratinhos, que deverá apresentar um volume muito reduzido, e conhecendo as baixas E.E., torna-se necessário concentrar a formulação de modo a poder administrar concentrações de antigénio superiores.

Deste modo, realizou-se novo passo de centrifugação que desta feita serviu também de concentração da formulação lipossomal, reduzindo-se o volume desta ao mínimo.

Quadro 3.1.6.4 – Cálculos das E.E. após passo de concentração através de centrifugação

Rendimento Proteína (%)	Razão prot /lip inicial	Razão prot/líp final	E.E. (%)
$7 \pm 0,2$	$13 \pm 0,04$	$3 \pm 0,09$	$21 \pm 0,06$

Os valores de E.E. foram calculados novamente após o passo de concentração verificando-se que se encontram nas mesmas condições iniciais como se pode ver no Quadro 3.1.6.4.

Um dos maiores desafios na incorporação de proteínas em lipossomas é a manutenção da integridade física de modo a preservar a sua bioactividade e estabilidade.

Para que os lipossomas contendo os antigénios de *S. equi* funcionem no processo de imunização, é indispensável que estes mantenham a sua integridade após

incorporação. Deste modo, a integridade estrutural e da massa molecular foram avaliados por SDS-PAGE como se representa na Figura 3.1.6.1.

Apesar do arrastamento de algumas bandas devido à presença lipídica não permitir traçar o perfil electroforético completo do extracto enzimático, verifica-se a integridade estrutural das proteínas presentes no extracto enzimático representadas na Figura 3.1.6.1. É também possível identificar o mesmo padrão de migração das proteínas em MLV e DRV extrusados, ou seja, logo após hidratação do filme lipídico, e nos lipossomas já dimensionados, concluindo-se que o processo de extrusão não danificou nenhum componente proteico.

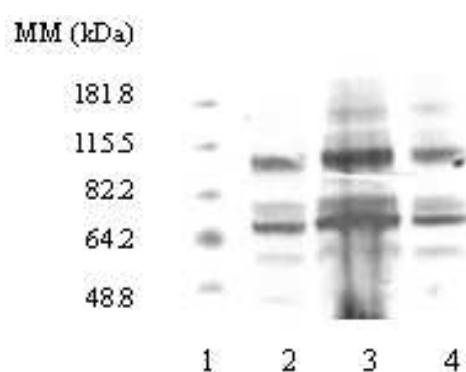


Figura 3.1.6.1 - Análise por SDS-PAGE do extracto de *S. equi* após encapsulação em lipossomas. Faixas: 1 – marcadores moleculares; 2 – extracto de *S. equi*; 3 – extracto de *S. equi* em MLV; 4 – Extracto de *S. equi* encapsulado em lipossomas.

A presença de um mesmo padrão de migração permite-nos inferir que as proteínas do extracto enzimático de *S. equi* foram incorporadas nos lipossomas com sucesso não havendo degradação da sua integridade estrutural. A proteína SeM de 58 kDa na sua forma nativa é visível nas 3 faixas verificando-se que não é danificada pelo processo de extracção enzimática, como já havia sido comprovado.⁸⁴ A ausência de bandas adicionais no padrão de migração exclui também processos de agregação ou fragmentação, reforçando a ideia de que este método de preparação dos lipossomas é indicado na encapsulação de proteínas. A manutenção da integridade estrutural de todo o extracto enzimático associado a níveis de E.E. na ordem dos 30% é ainda mais

importante quando se atribui à proteína SeM apenas 2,7% da composição do extracto total.⁸⁵

Estes resultados confirmam o potencial dos lipossomas na incorporação dos antígenos totais de *S. equi* e na sua futura utilização em estudos de imunização.

3.1.7 Método alternativo para separação da proteína não encapsulada

A separação da proteína não encapsulada por filtração gel surge como alternativa à separação por ultracentrifugação quando se desejam separar quantidades muito reduzidas.

Para tal, recorreu-se a colunas com gel Sephadex G-200, nas quais se pretendia eluir primeiramente a fracção lipossomal e só depois a proteína uma vez que o limite de exclusão se situa entre os 5-600 kDa. Foram utilizadas dois tamanhos de colunas, uma de 10 cm e outra de 20 cm, aplicando-se fracções de lipossomas vazios (LV), lipossomas vazios juntamente com proteína (P+LV) e apenas proteína em solução aquosa (P) de modo a traçar cada um dos perfis de eluição.

A primeira aplicação foi realizada em colunas equilibradas com tampão citratos, pH=5,6 e com uma concentração de proteína de 0,42mg/ml.

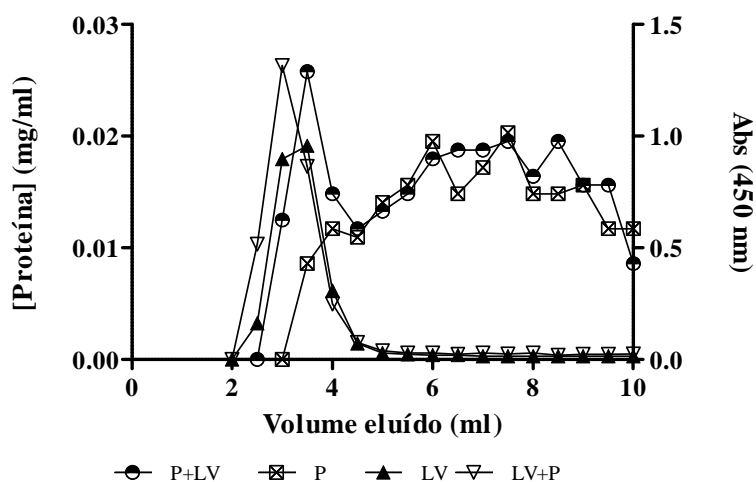


Figura 3.1.7.1 - Perfil de eluição numa coluna de 10 cm de gel Sephadex G-200 equilibrada com tampão citratos pH=5,6. Aplicações de 300 µl de cada amostra. P = proteína livre; LV = lipossomas vazios;

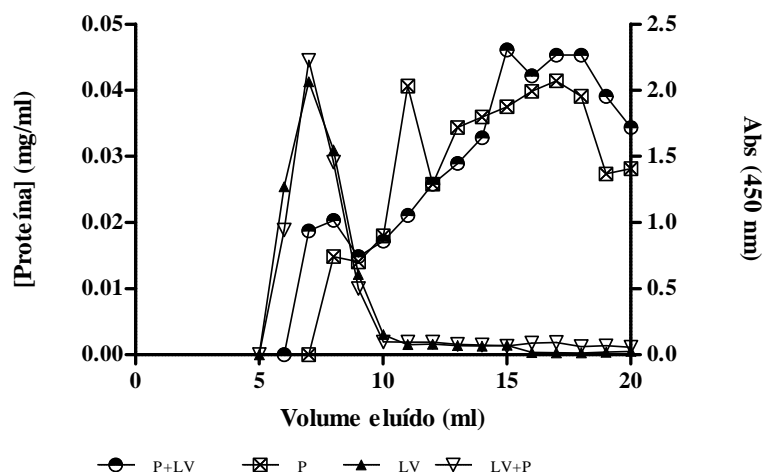


Figura 3.1.7.2 - Perfil de eluição numa coluna de 20 cm de gel Sephadex G-200 equilibrada com tampão citratos pH=5,6. Aplicações de 1ml de cada amostra. P = proteína livre; LV = lipossomas vazios;

Como se pode ver na Figura 3.1.7.1 e Figura 3.1.7.2 uma parte do extracto enzimático elui juntamente com a fracção lipossomal, o que não era esperado, uma vez que o limite de exclusão é de 600kDa. Verifica-se ainda que mesmo a proteína sozinha, é eluída em fracções iniciais, o que exclui a hipótese de arrastamento da proteína pelos lipossomas. Neste sentido tudo leva a crer que ocorrerá agregação de parte da proteína que acaba por ser eluída juntamente com os lipossomas. De seguida repetiu-se o procedimento, aumentando a concentração de proteína de modo a perceber se este parâmetro teria alguma influência no perfil de eluição.

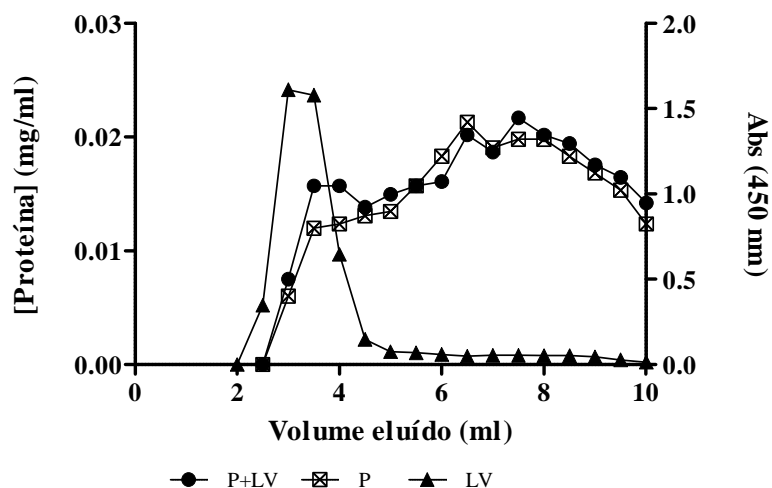


Figura 3.1.7.3 - Perfil de eluição numa coluna de 10 cm de gel Sephadex G-200 equilibrada com tampão citratos pH=5,6. Aplicações de 300 μ l de cada amostra. P = proteína livre; LV = lipossomas vazios;

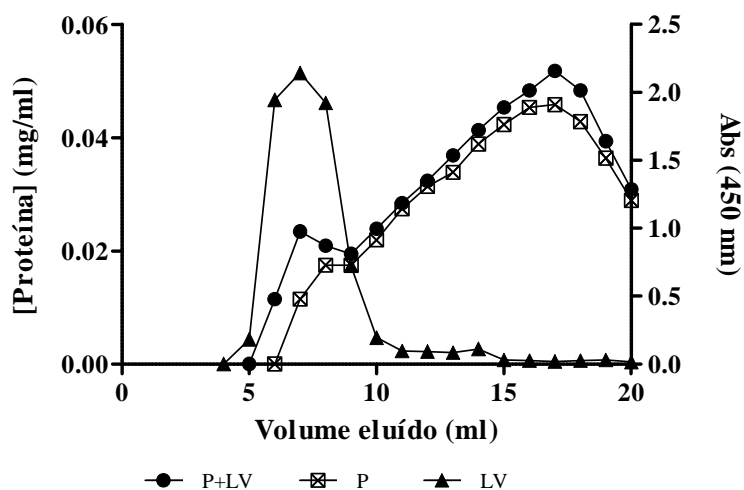
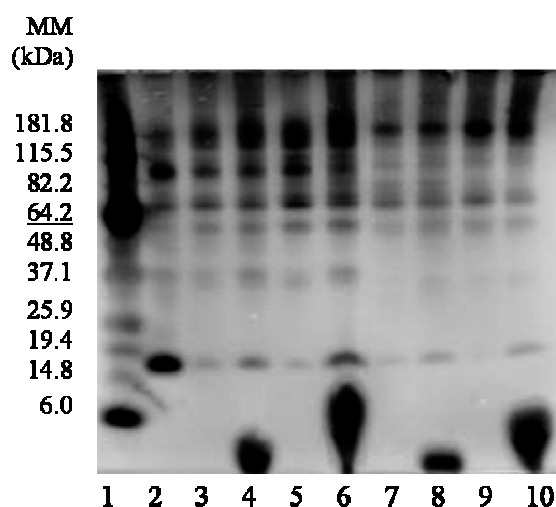


Figura 3.1.7.4 - Perfil de eluição numa coluna de 20 cm de gel Sephadex G-200 equilibrada com tampão citratos pH=5,6. Aplicações de 1ml de cada amostra. P = proteína livre; LV = lipossomas vazios;

Mesmo para concentrações de proteína superiores continuou-se a verificar que parte da proteína é eluída juntamente com os lipossomas. Estas fracções correspondem a 22% do total de proteína quando aplicada sozinha e 26% quando a proteína é aplicada juntamente com os lipossomas vazios em coluna de 10 cm. No caso das colunas de 20

em 21% do total de proteína é eluído juntamente com os lipossomas quando a proteína é aplicada sozinha e 24% quando a proteína é aplicada juntamente com os lipossomas vazios. Uma vez que a quantidade relativa de proteína eluída nas fracções iniciais é praticamente a mesma, confirma-se mais uma vez que este fenómeno não se deverá a o arrastamento da proteína pelos lipossomas.

De modo a perceber a natureza da proteína que é eluída juntamente com a fracção lipossomal, realizou-se um SDS-PAGE em condições redutoras e não redutoras para as mesmas amostras.



3.1.7.5 - Gel SDS-PAGE das fracções de a eluída juntamente com os lipossomas, em es redutoras e não redutoras. 1- marcadores lares; 2- Extracto enzimático (3 - 7P; 4-7PV; 5- 7PV)+DTT; (7- 7P; 8- 7PV; 9- 8P; 10- 7PV) T. P-proteína; PV-proteína+lipossomas vazios

Comparando as fracções eluídas de proteína e de proteína aplicada juntamente com os lipossomas verifica-se que não existem grandes diferenças, pelo que o que se encontra a eluir juntamente com os lipossomas é mesmo proteína do extracto enzimático. Como previsto encontram-se bandas na parte superior do gel que são mais visíveis quando a amostra não é tratada com DTT, e que portanto correspondem a proteína aglomerada.

Uma vez que esta proteína aglomerada seria fruto da troca de tampão fosfatos por água purificada, traçou-se o perfil de eluição do extracto juntamente com lipossomas em tampão fosfatos, em colunas equilibradas com o mesmo tampão.

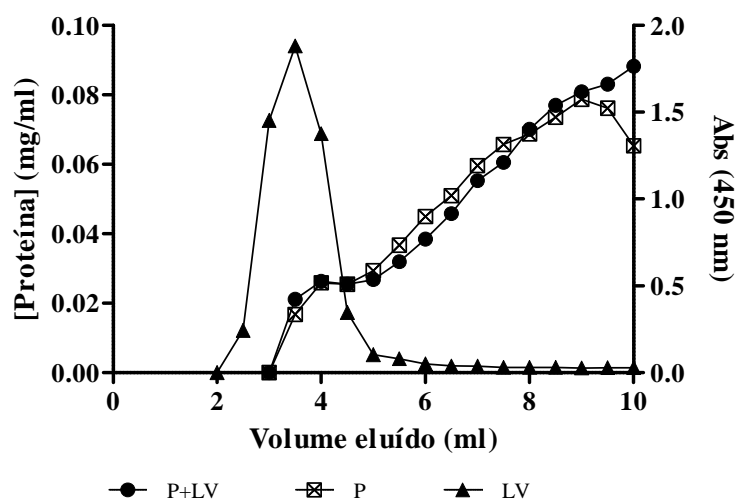


Figura 3.1.7.6 - Perfil de eluição numa coluna de 10 cm de gel Sephadex G-200 equilibrada com tampão fosfatos. Aplicações de 300 μ l de cada amostra. P = proteína livre; LV = lipossomas vazios

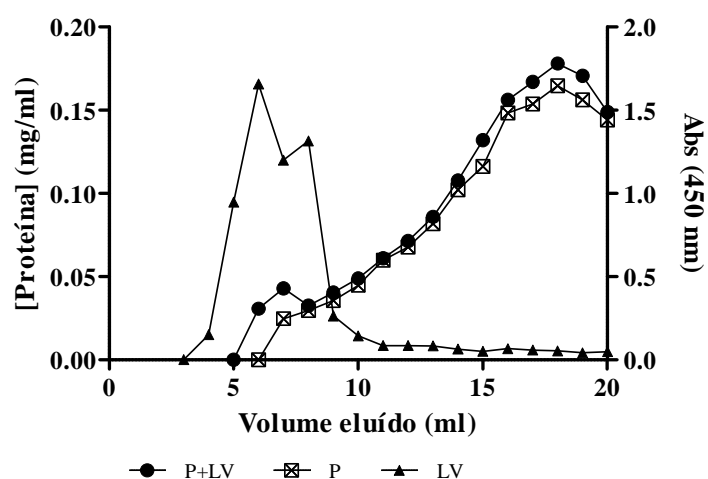


Figura 3.1.7.7 – Perfil de eluição numa coluna de 20 cm de gel Sephadex G-200 equilibrada em tampão fosfatos. Aplicações de 1 ml de cada amostra. P = proteína livre; LV = lipossomas vazios

Neste caso, apesar de se verificar uma diminuição da quantidade relativa de proteína agregada, continua a verificar-se eluição juntamente com a fracção lipossomal. A proteína eluída juntamente com os lipossomas corresponde a 12% do total de proteína para a proteína sozinha e 14% quando a proteína é aplicada juntamente com os

lipossomas vazios na coluna de 10 cm. Quanto à coluna de 20 cm os valores são semelhantes sendo que a proteína eluída juntamente com os lipossomas corresponde a 13% do total de proteína para a proteína sozinha e 16% quando a proteína é aplicada juntamente com os lipossomas vazios.

Uma vez que os perfis de eluição de proteína livre haviam sido realizados antes do processo de extrusão, para descobrir se os agregados de proteína ficariam retidos no filtro do extruder, realizou-se uma extrusão apenas da proteína seguida da eluição em coluna G-200, em condições redutoras e não redutoras.

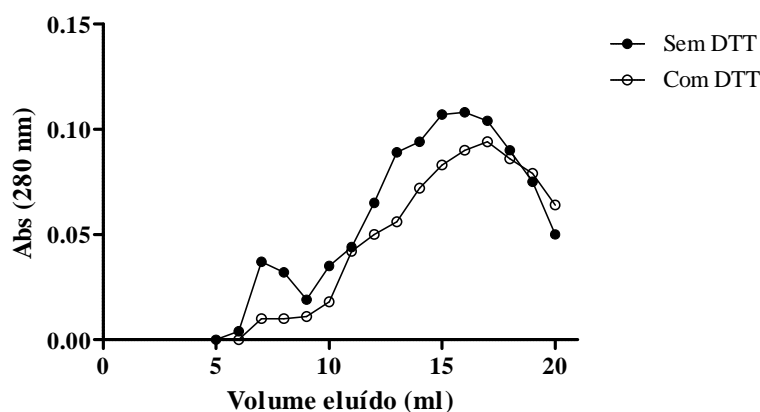


Figura 3.1.7.5 - Perfil de eluição da proteína a 280 nm, com e sem DTT

Uma vez que o DTT interfere com o método de Lowry na quantificação de proteínas, traçou-se o perfil de eluição da proteína a 280nm. Observa-se que a área do primeiro pico com DTT em relação à área total (4,9%) sob a curva não é significativamente inferior à do primeiro pico da proteína em tampão sem DTT (11,6%).

Por outro lado, pode-se constatar que o primeiro pico de eluição de proteína em tampão com DTT é bastante mais reduzido do que os obtidos até ao momento. O DTT como agente redutor irá reduzir as pontes dissulfureto que existam entre proteínas e provavelmente contribuirá para a diminuição das proteínas aglomeradas.

Deste modo, a separação de proteína não incorporada em lipossomas por filtração gel processou-se em coluna equilibrada com tampão citratos, uma vez que o tampão fosfatos interfere com o método de Rouser e o DTT interfere como o método de

Lowry. Não se tendo encontrado um método alternativo satisfatório este método foi o escolhido, sabendo-se de antemão que parte da proteína agregada é eluída juntamente com a fracção lipossomal e que não se encontra verdadeiramente incorporada nos lipossomas.

3.1.8 Estudos de estabilidade

A estabilidade física dos lipossomas pode ser afectada através de dois parâmetros: alterações no tamanho devido a fenómenos de agregação/fusão ou perda da proteína através da bicamada fosfolípida. Entre outras causas de degradação estão ainda a oxidação dos componentes lipídicos e/ou hidrólise das ligações éster entre esses mesmos componentes.⁷⁸

A estabilidade dos lipossomas pode então ser afectada por aqueles dois fenómenos não só quando se encontram em suspensão como também em termos de estabilidade durante o armazenamento em condições normais de temperatura e humidade.⁸⁷

Considerando que a agregação e fusão dos lipossomas provocam a alteração do diâmetro médio dos lipossomas, assim como a respectiva distribuição granulométrica, este parâmetro pode ser usado como um indicador das alterações físicas das vesículas. Por outro lado a estabilidade química também pode ser aferida através da quantificação dos componentes lipídicos e proteicos.

A temperatura é também um factor decisivo na estabilidade física sendo que lipossomas acondicionados a 25°C demonstram uma estabilidade inferior a formulações acondicionadas a 4°C pelo que os lipossomas são acondicionados e testados a esta temperatura.⁸⁶

3.1.8.1 Estabilidade à temperatura ambiente durante 24h

Traçou-se o perfil de estabilidade ao longo de 24h à temperatura ambiente (22 °C) para verificar que a formulação usada na vacina se encontrava estável, entre preparação e vacinação. A proteína não encapsulada foi separada por filtração gel, em coluna Sephadex G-200 de 10 cm com aplicações de 300 µl em triplicado.

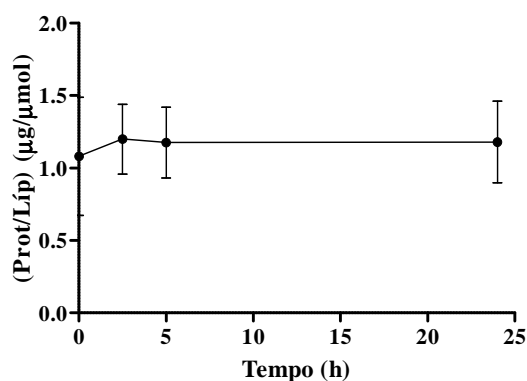


Figura 3.1.8.1 – Variação da razão proteína/lípido ao longo de 24h de lipossomas positivos encapsulando antígenos totais de *S. equi*, à temperatura ambiente.

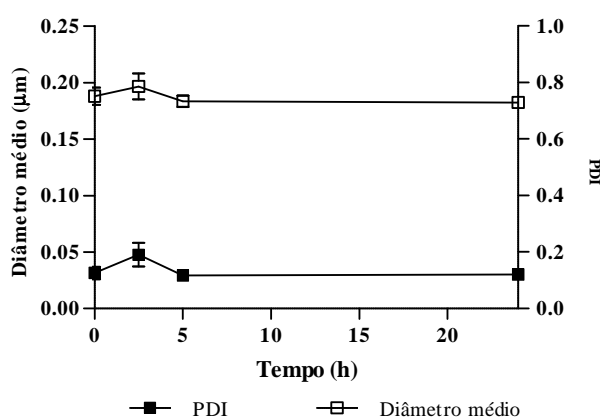


Figura 3.1.8.2 – Variação do diâmetro médio e PDI de lipossomas encapsulando *S. equi* ao longo de 24h, à temperatura ambiente.

A análise dos perfis de estabilidade ao longo de 24h permite confirmar que os lipossomas mantêm a sua integridade física, uma vez que se apresentam com o mesmo diâmetro médio e PDI ao longo do tempo.

Por outro lado, a integridade química também permanece uma vez que não se verificam alterações significativas da razão proteína/lípido ao longo do tempo. Observa-se no entanto uma grande variabilidade nos resultados obtidos. Esta variabilidade terá origem no método de separação de proteína não encapsulada, uma vez que o perfil de eluição numa cromatografia de exclusão molecular sofre variações consoante o tipo de empacotamento e o próprio tamanho da coluna,

A integridade estrutural dos antígenos encapsulados em lipossomas foi também avaliada através de SDS-PAGE.

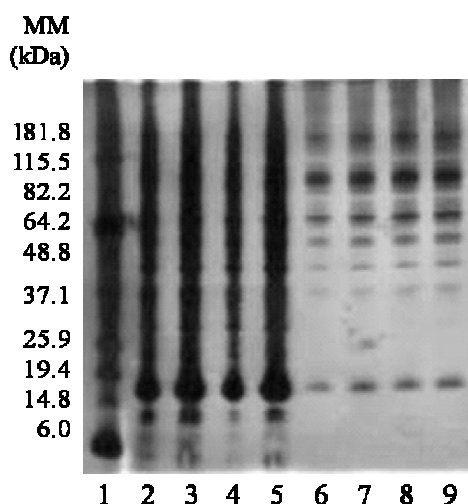


Figura 3.1.8.3 – Gel SDS-PAGE da evolução de lipossomas encapsulando antígenos totais ao longo de 24h. 1- marcadores moleculares; 2, 3 – lipossomas; 4, 5 – DRV's; 6 – t=0; 7 – t=2,5h; 8 – t=2,5h; 9 – t=24h

Como se pode observar na Figura 3.1.8.3 a integridade estrutural dos lipossomas mantém-se ao longo de 24h, à temperatura ambiente. Uma vez que a coloração do gel foi efectuada com nitrato de prata, um método muito sensível, as bandas com maiores concentrações de proteína encontram-se um pouco imperceptíveis. No entanto, em comparação com o perfil electroforético (Figura 3.1.2.1) obtido anteriormente para o

extracto enzimático, é possível confirmar a manutenção da integridade estrutural das proteínas ao longo do tempo de armazenamento à temperatura ambiente.

3.1.8.2 Estabilidade a 4°C durante 3 dias

A mesma formulação contendo antígenos totais de *S. equi* foi acomodada a 4°C e durante 72h retiraram-se amostras a tempos regulares. O perfil de estabilidade foi traçado para este intervalo de tempo verificando a estabilidade química e física da composição.

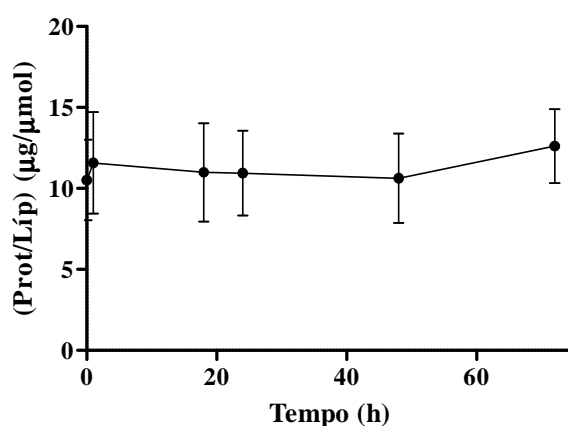


Figura 3.1.8.4 – Variação da razão proteína/lípido ao longo de 72h de lipossomas positivos encapsulando antígenos totais de *S. equi*, a 4°C.

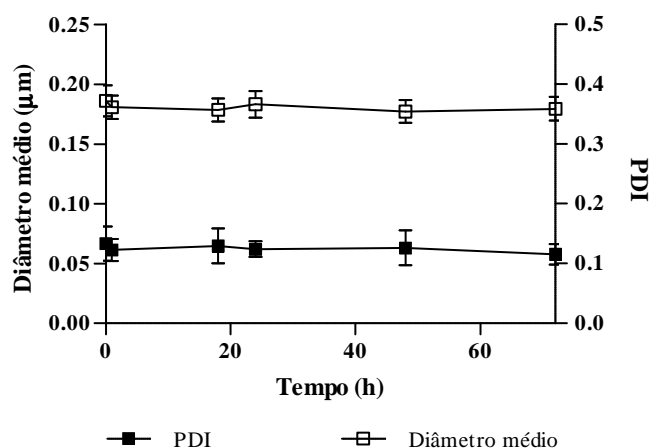


Figura 3.1.8.5 - Variação do diâmetro médio e PDI de lipossomas encapsulando *S. equi* ao longo de 72h, a 4°C

Mais uma vez a análise dos perfis de estabilidade ao longo de 72h permite confirmar que os lipossomas mantêm a sua integridade física, uma vez que se apresentam com o mesmo diâmetro médio e PDI ao longo do tempo.

Por outro lado, a integridade química apresenta-se de um modo um pouco inconclusivo. No perfil de proteína/lípido traçado ao longo do tempo continua-se a observar que o método de separação utilizado apresenta um problema de reprodutibilidade. As variações observadas ao longo do tempo são, como já foi referido, de origem experimental, não se correlacionando com o tempo de armazenamento.

A integridade estrutural dos antígenos encapsulados em lipossomas ao longo das 72h foi também avaliada através de SDS-PAGE.

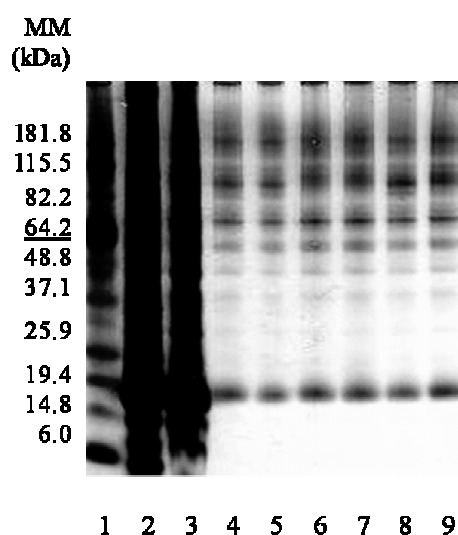


Figura 3.1.8.6 - Gel SDS-PAGE da evolução de lipossomas encapsulando antígenos totais ao longo de 72h. 1- marcadores moleculares; 2 – LVs; 3 – DRVs; 4 – t=0; 5 – t=1h; 6 – t=18h; 7 – t=24h; 8 – t= 48h; 9 – t=72h

A integridade estrutural dos lipossomas mantém-se ao longo de 72h, à temperatura de 4°C, como se pode observar na figura 3.1.8.6. Apesar da determinação química ser um pouco inconclusiva a manutenção da intensidade das bandas das proteínas ao longo do tempo leva a crer que a quantidade de proteína presente nos lipossomas mantém-se ao longo das 72 h.

Deste modo pode-se concluir que a formulação apresenta estabilidade, a 24h e 72h durante tempo suficiente para preparação dos lipossomas e posterior vacinação.

3.1.9 Perfil de libertação

O perfil de libertação de proteína dos lipossomas foi seguido ao longo de 6 semanas, tendo-se quantificado a proteína presente no sedimento lipossomal após centrifugação, uma vez que a proteína presente no sobrenadante era muito reduzida.

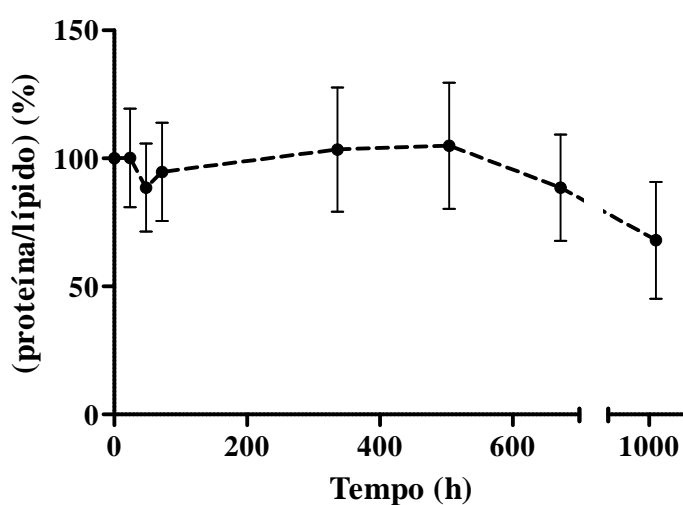


Figura 3.1.9.1 – Perfil de libertação da proteína in vitro da formulação lipossomal

Apesar de os nanosistemas exibirem normalmente um efeito de libertação rápida inicial, conhecido como “burst”⁷⁷ este fenómeno não ocorre com esta formulação (Figura 3.1.9.1). No entanto é visível que a partir da quarta semana ocorre uma destabilização dos lipossomas verificando-se esse facto não só a nível da libertação da proteína como também a nível dos diâmetros médios.

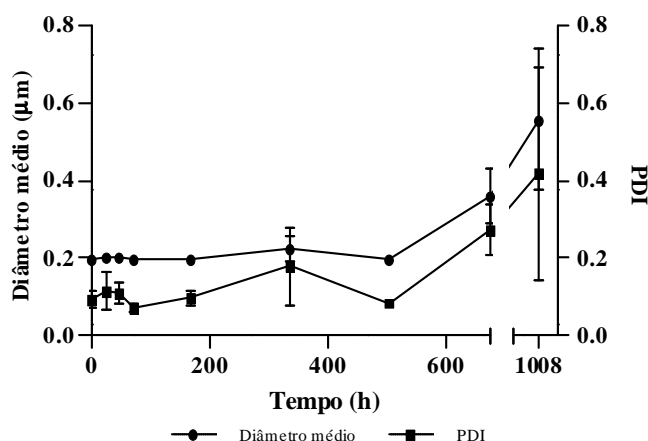


Figura 3.1.9.2 - Variação dos diâmetros médios de lipossomas contendo extracto de *S. equi* ao longo de 6 semanas *in vitro*

Como já foi referido, o perfil dos diâmetros médios é um indicador bastante fiável da integridade dos lipossomas, e este indicou-nos claramente uma destabilização da formulação lipossomal a partir da quarta semana, acompanhada de libertação de proteína.

A libertação da proteína dá-se de uma maneira muito reduzida, reflectindo a estabilidade destes lipossomas em meio fisiológico. No final do ensaio verifica-se que 68% da proteína inicialmente presente nos lipossomas ainda se encontra associada a estas vesículas.

Sendo a libertação por destabilização das formulações muito dependente da composição lipídica,⁷⁸ as características desta libertação, levam a crer que se trata de uma formulação estável e pouco permeável à libertação das proteínas. A libertação prolongada dos antígenos é essencial para que se preserve uma quantidade considerável nos lipossomas quando estes são capturados pelas APC,⁷⁸ sendo que quanto maior a quantidade de antígeno mais prolongada será a resposta imune e a activação dos linfócitos T.

Deste modo, os lipossomas catiónicos, encapsulando os antígenos totais de *S. equi*, confirmam-se com potencial para a vacinação contra a gurma.

3.2 Lipossomas mucoadesivos

O uso de lipossomas revestidos com polímeros mucoadesivos é uma estratégia bastante apelativa de administração de proteínas, uma vez que a mucoadesão pode prolongar o tempo de exposição e contacto destes veículos com as mucosas. Ao aumentar o tempo de residência nos locais alvo é de se esperar uma melhor absorção dos lipossomas e consequentemente uma maior exposição ao antigénio.

Os polímeros carregados podem-se ligar a lipossomas de cargas contrárias através do mecanismo básico de conjugação de cargas, formando complexos que apresentam propriedades mucoadesivas.⁸⁸ O quitosano apresenta-se como um óptimo candidato entre os vários polímeros mucoadesivos existentes uma vez que não apresenta toxicidade, é biocompatível e biodegradável.⁸⁸ O quitosano exibe também uma actividade imunoestimuladora, levando à acumulação e activação dos macrófagos e células polimorfonucleares, promovendo a resistência à infecção pelas citocinas e aumentando a resposta imune celular.⁸⁹

Num estudo preliminar sobre o comportamento do quitosano, prepararam-se lipossomas carregados negativamente (formulação C) vazios que foram de seguida incubados com o polímero. O quitosano é obtido por hidrólise química controlada e desacetilação da quitina podendo ser obtido com massas moleculares variáveis, neste estudo usaram-se três polímeros diferentes.

Após incubação, durante 24h, a diferentes temperaturas e separação por centrifugação, quantificou-se o quitosano livre presente no sobrenadante. A quantificação foi feita relativamente a soluções de quitosano incubadas nas mesmas condições, na ausência de lipossomas, diluídos nas mesmas proporções com tampão citratos.

Quadro 3.1.9.1 – Quantidades de quitosano presentes no sobrenadante após incubação de lipossomas negativos com quitosano de baixa (BMM), média (MMM) e elevada (EMM) massa molecular

	% de quitosano no sobrenadante		
	BMM	MMM	EMM
Temperatura ambiente	40 ± 4	44 ± 4	72 ± 3
4°C	24 ± 9	16 ± 6	16 ± 1
37°C	57 ± 5	44 ± 3	55 ± 1

Como se pode verificar no Quadro 3.1.9.1 uma grande percentagem de quitosano ficou adsorvida na superfície dos lipossomas. De modo a verificar se a quantidade de quitosano adsorvido na superfície de lipossomas seria suficiente para alterar a carga superficial destes mediu-se os potenciais zeta das vesículas.

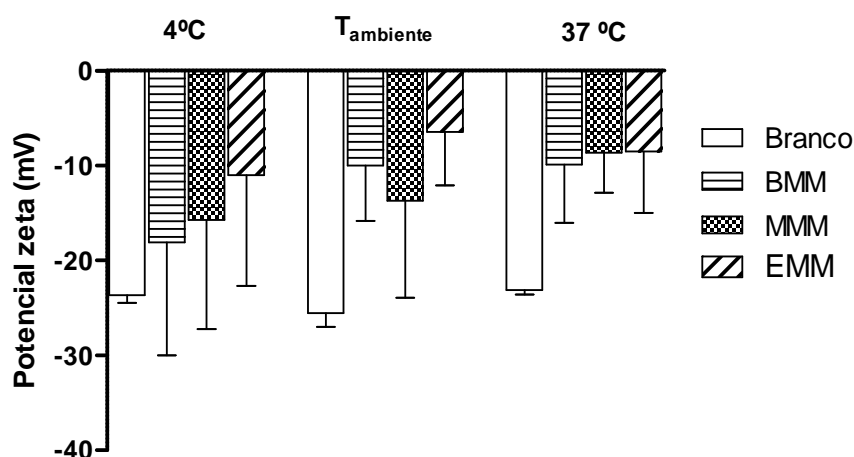


Figura 3.1.9.1 – Potencias zeta de lipossomas negativos após incubação com quitosano

A análise do potencial zeta revela que efectivamente ocorreu uma alteração à superfície dos lipossomas, não sendo no entanto suficiente para anular a carga superficial negativa das partículas. Este efeito seria o desejado uma vez que, como já foi referido as células das mucosas exibem uma carga total negativa, sendo de se esperar que partículas carregadas positivamente adiram com mais facilidade.

Devido à carga negativa dos lipossomas e carga positiva do quitosano, é de se esperar que o revestimento dos lipossomas aconteça por meio de interações iónicas, existindo também a probabilidade de ligações de hidrogénio entre o poliósido e os grupos fosfolipídicos.^{69,89,90} Deste modo, a diminuição do potencial zeta sugere a formação de complexos iónicos entre a PG e o quitosano.

No entanto, a carga superficial positiva não é condição obrigatória para que ocorra mucoadesão. Partículas neutras revelaram ser mucoaderentes, logo a interacção entre o quitosano e as células das mucosas não se pode explicar apenas devido a interações iónicas.⁹¹ Fenómenos de interpenetração entre a camada mucosa e os polímeros mucoadesivos, podem estar envolvidas na interacção entre estes dois componentes, onde intervêm principalmente ligações de hidrogénio e van der Waals.

Estas forças estão dependentes da estrutura química dos polímeros, como sendo os grupos amina e hidroxilo e flexibilidade das cadeias.^{88,92}

Mesmo em agentes mucoadesivos como o carbopol, um polímero hidrossolúvel que exibe carga negativa, verifica-se uma adesão mais eficaz do que a dos lipossomas carregados positivamente não revestidos. Estes dados apoiam a sugestão de que ocorrerá uma interacção muito importante entre polímero e mucosa, facilitando a adesão dos lipossomas revestidos com polímero. As propriedades mucoadesivas podem até revelar-se mais eficazes que os lipossomas carregados positivamente na adesão as células das mucosas.^{93,94}

Deste modo, o revestimento de lipossomas carregados negativamente, encapsulando antígenos totais de *S. equi*, pelo quitosano, parece uma alternativa desejável que se deverá estudar em mais pormenor.

Seria também importante avaliar o nível de mucoadesão destas partículas *in vitro* através da medição da força de ligação entre o polímero e as camadas de muco de tecidos animais ou através da quantificação de ligação dos polímeros a mucina.⁹³

3.3 Experimentação animal

3.3.1 Preparação da vacina

Este trabalho teve como objectivo investigar a possibilidade da utilização dos antígenos totais a partir da extracção enzimática, encapsulados em lipossomas, para administração pela via nasal. Esta estratégia apresenta-se bastante promissora, uma vez que não se conhecem exactamente quais os antígenos que conferem protecção e que este método de preparação de antígenos é bastante menos dispendioso do que a purificação de proteínas.

A falha das vacinas administradas pela via parentérica em provocar a imunidade local a nível das mucosas, coloca a hipótese da administração pela via nasal, o que poderá possibilitar a neutralização do antígeno numa primeira exposição.

Em animais recuperados da infecção pela *S. equi* a imunidade adquirida dirige-se maioritariamente contra a proteína SeM.⁸ No entanto as vacinas baseadas nesta proteína não conferem protecção aos animais contra a infecção por *S. equi*.¹⁷

Neste sentido, incorporou-se em lipossomas o extracto enzimático obtido como descrito anteriormente. A análise do gel de SDS-PAGE, na Figura 3.3.1.1, permite identificar o padrão de migração das várias proteínas a encapsular. Este padrão está de acordo com resultados anteriores, pelo que se pode confirmar o processo de extracção enzimática bem sucedido.

Por outro lado, é importante verificar a imunogenicidade das proteínas presentes no extracto. Na mesma figura, verifica-se que todas as bandas respectivas a antígenos, separados por SDS-PAGE, encontram correspondência no *Western blot* realizado com soro de cavalo recuperado de gurma. Desta forma pode-se afirmar que o extracto a encapsular e usar na vacinação apresenta todas as condições para provocar a imunização dos animais.

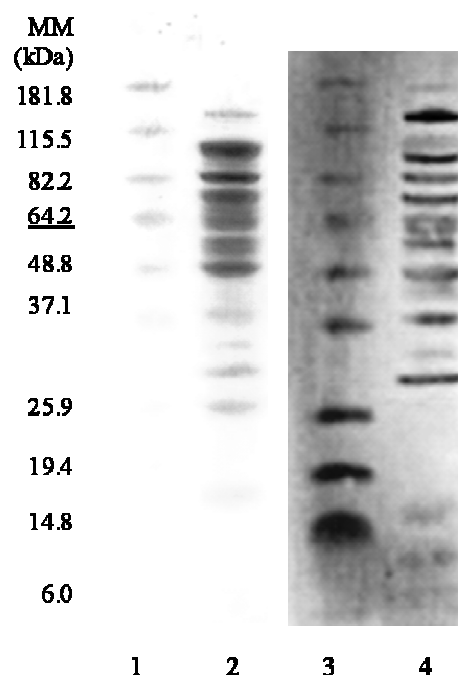


Figura 3.3.1.1 – Análise por SDS-PAGE (1 e 2) e Western Blot (3 e 4) do extracto enzimático a utilizar na vacinação. 1 e 3 – marcadores moleculares 2 e 5 – extracto enzimático

De modo a determinar o potencial de imunização desta formulação, camundongos BALB/c foram vacinados pela via intranasal.

A composição e caracterização dos lipossomas usados na primeira imunização e no reforço encontram-se definidos no Quadro 3.3.1.1.

Quadro 3.3.1.1 – Caracterização física e química da formulação usada no processo de imunização

		[Proteína] mg/ml	E.E. (%)	Potencial Zeta (mV)	Diâmetro médio (µm)	PDI
1ª imunização	Lipossomas vazios			14 ± 0.8	0.18 ± 0.00070	< 0.102
	Lipossomas	8 ± 0.4	24 ± 1	12 ± 4	0.22 ± 0.00068	< 0.242
Reforço	Lipossomas vazios			12 ± 1	0.20 ± 0.0028	< 0.149
	Lipossomas	8 ± 0.08	32 ± 0.2	11 ± 3	0.22 ± 0.0045	< 0.285

Estes lipossomas apresentam as características já obtidas e discutidas anteriormente nos estudos preliminares de eficiência de encapsulação. Como se pode verificar, trata-se de uma população homogénea de lipossomas com um diâmetro próximo dos 0,20 μm . A formulação apresenta uma carga positiva que se espera vir a auxiliar na adsorção à camada mucosa, assim como na internalização pelas APC.

3.3.2 Resposta imune

A reposta imune desenvolvida pelos animais foi seguida ao longo dos 114 dias de duração deste ensaio. A administração nasal dos lipossomas resultou num soro anti-extracto enzimático logo na segunda semana após imunização. As respostas específicas anti-IgG, IgG1 e IgG2a verificam-se ao longo de todo o ensaio, após a primeira imunização. Após o reforço, que se realizou na terceira semana, verifica-se um aumento nos níveis das IgG assim como dos seus subtipos, IgG1 e IgG2a.

Os níveis de imunoglobulinas continuam a aumentar até à 8ª semana, após a primeira imunização, o que se pode relacionar com o destino dos lipossomas *in vivo*. É possível que os lipossomas funcionem como um reservatório de antígeno para as APC e células M, favorecendo o processamento eficiente dos lipossomas e apresentação de antígeno na superfície das APC.

Embora grande parte dos antígenos contidos nos lipossomas sejam capturados pelas APC e processados pela via endossomal, espera-se que alguns destes antígenos consigam escapar para o citoplasma sendo apresentados à superfície pelo MHC I⁷¹ e fazendo aumentar os níveis de IgG2a.

Por outro lado, não foram detectados anticorpos específicos no soro de animais imunizados com lipossomas vazios.

Os animais vacinados com lipossomas contendo antígenos de *S. equi*, não manifestaram qualquer tipo de reacção adversa, o que são factos de extrema importância, uma vez que constituem uma das maiores desvantagens das vacinas baseadas em extractos de *S. equi*.⁴

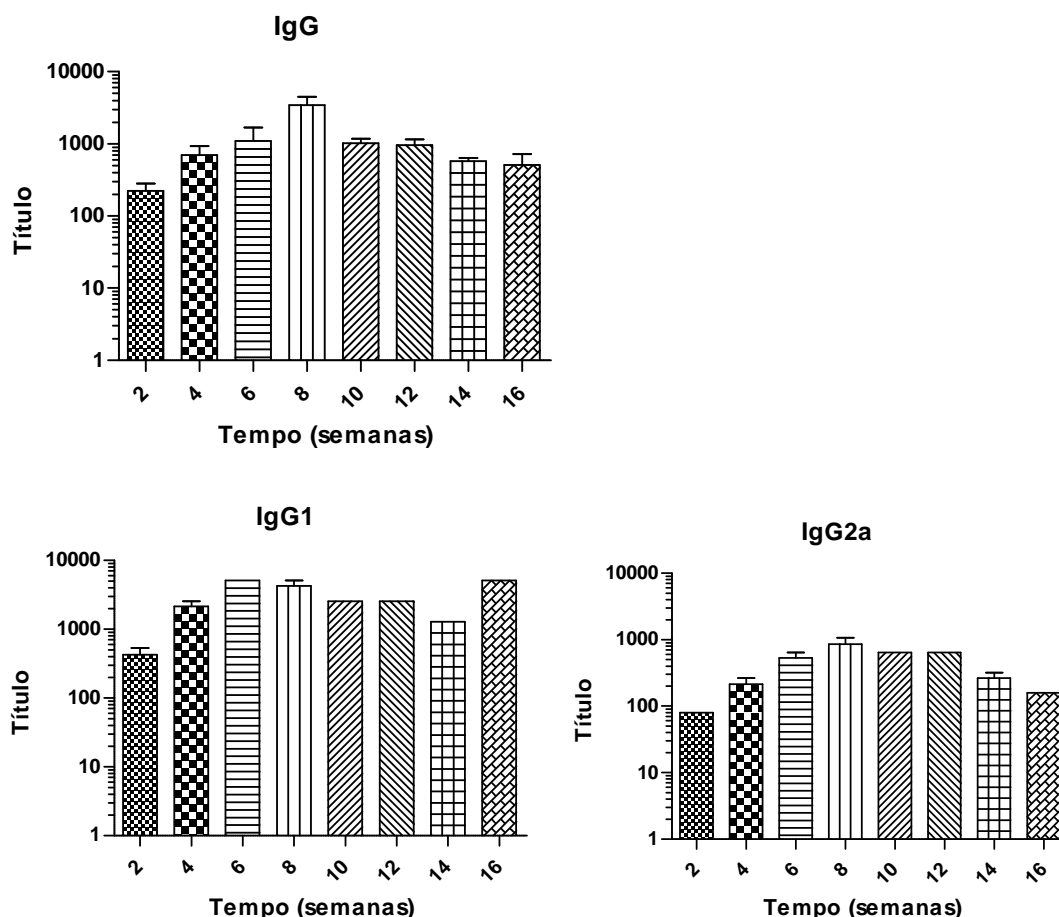


Figura 3.3.2.1 – Anticorpos específicos IgG, IgG1 e IgG2a em soros de animais imunizados pela via i.n. com lipossomas encapsulando extracto enzimático de *S. equi*. (n=5; média ± SEM)

Estes resultados demonstram que os lipossomas são eficazes na estimulação da resposta imunitária, contra antígenos de *S. equi*, e que funcionarão como reservatórios de antígeno uma vez que se verifica uma resposta imune prolongada ao longo do tempo da experiência. Este efeito reservatório está de acordo com os resultados obtidos no perfil de libertação da proteína *in vitro* (Figura 3.1.9.1) uma vez que se verificou uma libertação lenta e controlada da proteína em condições fisiológicas.

A produção de uma resposta imune com componente Th1 é vital para que ocorra erradicação de microrganismos e consequentemente a prevenção da infecção por *S. equi*.²⁶ No decorrer deste estudo verifica-se que ocorre uma resposta mista, pois a

resposta Th1 não é predominante sobre a Th2, sendo ambas igualmente estimuladas pela vacina lipossomal.

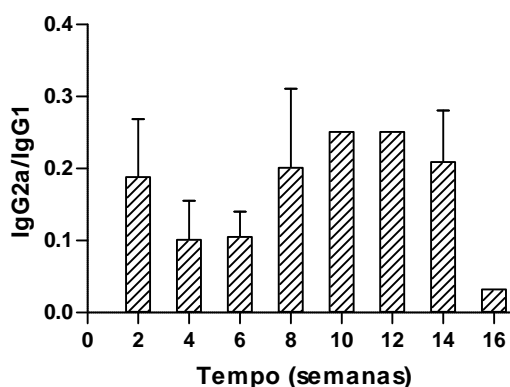


Figura 3.3.2.2 – Relação IgG2a/IgG1.(n=5; média ± SEM)

Verifica-se um arranque mais lento da resposta celular o que poderá ter a ver com o perfil de libertação dos lipossomas. Segundo o que se verificou sobre a velocidade de libertação das proteínas a partir da formulação lipossomal, esta ocorre de uma forma lenta e equilibrada até à terceira semana, momento a partir do qual os lipossomas se encontram menos estáveis, ocorrendo mais oportunidades para que os antígenos sejam libertados directamente para o citosol.

3.3.3 Resposta imune local

Sendo a gurma uma doença do tracto respiratório, a resposta imune local através da produção de IgA na forma secretada terá um papel importante ou até fundamental na imunização dos animais.⁴⁸ Nestes locais, os linfócitos serão activados, promovendo a produção da IgA secretória, estabelecendo uma primeira linha de defesa a nível das superfícies das mucosas. Por sua vez, as sIgA podem bloquear a ligação das bactérias *S. equi*, mostrando-se mais eficazes do que as imunoglobulinas do soro. Por outro lado, a imunização das mucosas provocará não só a produção de sIgA, como também promoverá a imunização sistémica humoral e celular.⁹⁵

A interacção entre antígeno, a mucosa nasal e o NALT depende de uma grande variedade de factores, mas essencialmente da natureza física do antígeno – solúvel ou em partículas.

Quando administrados pela via i.n. os antígenos solúveis conseguem penetrar no epitélio nasal, interagir com as APCs, drenando para o nódulo linfático cervical superficial que de seguida drena para os gânglios linfáticos superiores. Pelo contrário, antígeno em forma de partículas é facilmente detectado pelas células M e pelo NALT. O NALT drena preferencialmente para os gânglios linfáticos cervicais possibilitando uma resposta imunitária local e também a nível de outras mucosas, devido ao sistema imune comum das mucosas (CMIS).⁹⁵ A vacinação intranasal da forma solúvel dos antígenos de *S. equi* comprovou a previsão teórica da falha na indução da imunidade ao nível das mucosas, sendo que os níveis de IgA presentes nos pulmões eram apenas residuais.²⁵

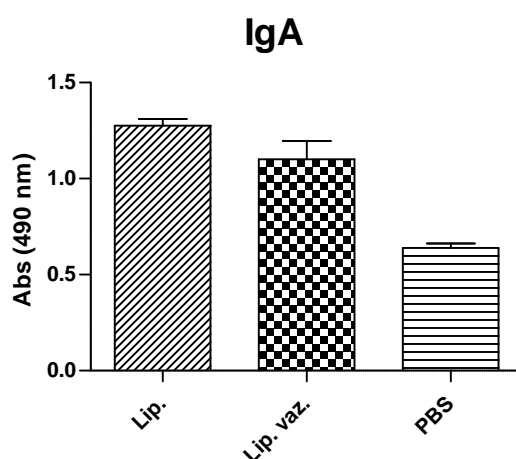


Figura 3.3.3.1 – Níveis de IgA específicos provocados pela imunização com lipossomas contendo extracto enzimático, lipossomas vazios e PBS. As diferenças não são significativas entre lipossomas vazios e lipossomas contendo extracto enzimático. Ambos são significativamente diferentes do PBS. (P-value<0,05) (n=5; média ± SEM)

Neste trabalho, e apesar de se verificarem diferenças significativas entre as formulações lipossomas e o animais vacinados com PBS, o mesmo não se conclui entre a vacina lipossomal e os lipossomas vazios (p<0,05).

Devido à carga positiva das partículas é de se esperar que estas interajam de forma bem sucedida com as partículas negativamente carregadas da superfície mucosal,

prolongando a exposição ao antígeno. No entanto, a presença de sIgA específicos anti-*S. equi* em ratinhos vacinados com lipossomas vazios não parece muito plausível, tratando-se provavelmente de uma contaminação ou uma ligação não específica do ensaio de ELISA.

A comparação com os níveis de IgA apresentados em ratinhos vacinados com PBS indica que há uma diferença significativa e que portanto a formulação lipossomal foi eficaz na indução da imunidade local.

É necessário referir que o método de aplicação não é óptimo uma vez que a desproporção entre o tamanho da narina do ratinho e o volume aplicado dará sempre origem a perdas. Por um lado, parte da dose pode ser engolida, levando a uma administração oral, por outro, poderá chegar aos pulmões se o volume administrado for suficiente.³⁴

3.3.4 Produção de citocinas

Como já foi referido, o modo como o antígeno é apresentado às APC é fundamental no tipo de resposta que irá despoletar, influenciando a razão Th1/Th2. Estudos anteriores demonstraram que lipossomas contendo o antígeno fizeram aumentar a expressão de genes de certas citocinas, e que provocaram um desvio da resposta inicialmente de carácter humoral para uma resposta imune mista.^{36,96}

Neste estudo, e após se verificar uma resposta imune mista segundo a razão IgG2a/IgG1, seriam de esperar alterações a nível da expressão de citocinas. Em comparação com resultados obtidos para o extracto enzimático na forma solúvel²⁵ verifica-se que as quantidades são semelhantes para todas as citocinas excepto o INF- γ . Esta citocina apresenta valores muito superiores aos provocados pela forma solúvel dos antígenos (< 50 pg/ml) o que apoia a existência de uma estimulação da resposta celular por esta formulação lipossomal.

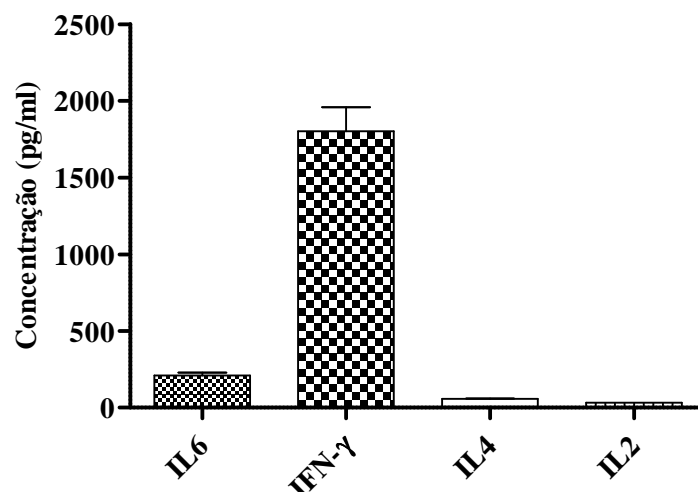


Figura 3.3.4.1 – Níveis de IL-6, INF- γ , IL-4 e IL-2 induzidos após estimulação dos esplenócitos com extracto enzimático de *S. equi*.

Uma vez que as citocinas desempenham um papel importante na activação, crescimento e diferenciação dos linfócitos B e T é bastante importante verificar alterações a nível da sua expressão. As citocinas IL2 e IFN- γ são secretadas pelos linfócitos Th1 e levam à activação de células B que se diferenciam e secretam IgG2a. As citocinas IL-4 e IL-6 são produzidas pelas Th2 sendo a IgG1 o principal isotipo após activação das Th2. Estes resultados levam a crer que ocorre uma eficiente estimulação dos linfócitos Th1 e que portanto a formulação lipossomal se qualifica como estimuladora da resposta imune celular.

4. CONCLUSÕES

Apesar do progresso observado em relação à compreensão da patogénese de *S. equi*, a gurma continua a persistir como uma doença debilitante e temida em todo o mundo. Esta doença tem um grande impacto económico na produção equina não só a nível dos tratamentos dos animais infectados e mesmo a morte de alguns deles, como também devido aos custos associados à doença em termos de medidas de quarentena para prevenção do contágio.

A natureza problemática e demorada da detecção e tratamento da gurma aponta para o desenvolvimento de uma vacina que promete ser a estratégia mais indicada e segura para erradicar esta doença. No entanto, as vacinas disponíveis no mercado mostram-se pouco eficazes, induzindo imunidade reduzida, para além de frequentemente provocarem efeitos adversos.

Apesar de a proteína SeM ser um factor de virulência crucial na patogénese de *S. equi* a sua utilização em vacinas não se revela eficaz, pelo que o emprego dos antígenos totais surge como uma alternativa. Esta aproximação é também mais interessante do ponto de vista económico uma vez que não é tão dispendiosa quanto a purificação de proteínas.

Por outro lado, a resposta imune sistémica não se revela tão protectora quanto a imunidade a nível das mucosas, pelo que a imunização a partir destes locais se apresenta bastante promissora. Deste modo, e tendo em conta que o modo como o antígeno é apresentado tem repercussões no tipo de resposta despoletado, a administração de antígenos totais de *S. equi* associados a adjuvantes pela via nasal foi o método de imunização escolhido.

Os lipossomas estão descritos como um bom sistema adjuvante, uma vez que são preferencialmente capturados pelas células do sistema mononuclear fagocítico, facilitando a entrega do antígeno. Outras propriedades dos lipossomas contribuem para o estudo deste veículo na apresentação dos antígenos de *S. equi*: protecção do antígeno dos enzimas proteolíticos e possibilidade de libertação controlada do seu conteúdo para os fluidos biológicos (conceito de microreservatórios) ou para as células (por endocitose).

Neste estudo, observou-se que a simples variação da composição lipídica, pode fazer variar a E.E., sendo que estas dependem da interacção entre proteína e bicamada lipídica. A E.E. pode ser aumentada através da manipulação da composição lipídica de modo a favorecer as interacções electrostáticas, observando-se neste caso que os

lipossomas carregados têm mais hipótese de interagir com as proteínas. Dentre as várias formulações estudadas os lipossomas com carga superficial positiva apresentaram os maiores valores de E.E., para além de oferecerem vantagens na forma como o antígeno é apresentado às APC. Estes lipossomas com carga positiva podem destabilizar a membrana endossomal através da formação de complexos com os lípidos aniônicos endossomais, facilitando a entrega eficiente dos antígenos no citoplasma. Por outro lado, os lipossomas catiónicos são preferencialmente capturados na pelas APC, principalmente as DC.

O método de preparação é no entanto muitas vezes um entrave à encapsulação de proteínas em lipossomas uma vez que pode resultar na sua desnaturação. O método de desidratação-reidratação por ser menos agressivo e por se desenrolar em condições não desnaturantes é o mais indicado na encapsulação de proteínas e foi o utilizado nestes estudos. Sendo o seu tamanho um factor muito importante no comportamento *in vivo* dos lipossomas, o seu dimensionamento foi realizado por um processo de extrusão por filtros de porosidade conhecida. Obtiveram-se partículas com um tamanho médio de 0,20µm A manutenção da integridade dos antígenos após encapsulação foi verificada após SDS-PAGE, concluindo-se que este método se adequa à preservação dos antígenos de *S. equi* após encapsulação.

Segundo o perfil de libertação de lipossomas *in vitro* conclui-se que a formulação é bastante estável em condições fisiológicas, ocorrendo uma libertação de proteína residual ao longo das primeiras semanas. Este perfil de libertação possibilita uma captura eficiente dos antígenos pelas APC, uma vez que os lipossomas funcionam como um reservatório de antígenos e ao mesmo tempo protegendo-os da degradação.

O desempenho desta formulação foi avaliada *in vivo* evidenciando as potencialidades dos lipossomas como adjuvantes na entrega eficiente dos antígenos de *S. equi* ao SMF. A vacinação pela via intranasal demonstrou ser eficaz na incitação da resposta imune local como se verificou pela presença de sIgA a nível dos pulmões. Por outro lado os lipossomas provocaram uma resposta imune mista, com componente celular o que não se verifica para o antígenos na forma solúvel. O despoletar da resposta imune celular foi confirmado pelos valores elevados de IFN-γ presentes no soro dos animais imunizados, muito superior à provocada pelo antígeno na forma solúvel.

Por outro lado verificou-se que os lipossomas são eficazes na protecção dos antígenos da degradação extracelular, e que aumentam também a captura destes pelas

APC ao longo do tempo, observando-se uma resposta imune sustentada ao longo de todo o ensaio.

Deste modo, é possível concluir que os antígenos de *S. equi* encapsulados em são efectivamente capazes de despoletar uma resposta imune celular, muito desejada na erradicação dos organismos patogénicos. A presença de IgA confirma a imunização das mucosas, mais um passo essencial para se atingir a imunização dos animais contra *S. equi*.

O estudo preliminar do revestimento de lipossomas aniónicos com agente mucoadesivos foi efectuado, demonstrando que até um certo nível, existe revestimento dos lipossomas. A utilização destes veículos de entrega de antígenos é desejável uma vez que os agentes mucoadesivos podem facilitar a mucoadesão de uma maneira superior aos lipossomas carregados, pelo que este estudo deverá ser mais aprofundado.

De um modo geral é possível concluir que objectivo deste trabalho foi atingido, tendo-se produzido um agente de encapsulação de antígenos de *S. equi* eficaz no despoletar de uma resposta imune mista, e ao mesmo tempo observando-se a imunização das mucosas. A vacina produzida apresenta-se como segura, não se registando efeitos adversos que são muitas vezes identificados no uso de outros adjuvantes.

5. PERSPECTIVAS FUTURAS

No seguimento deste trabalho, tendo-se concluído que os lipossomas actuam com sucesso na incitação da resposta imune celular, humoral e das mucosas seria interessante estudar e caracterizar os mecanismos responsáveis pela sua captura pelas APC. Por outro lado seria igualmente importante estudar a biodistribuição destas partículas após administração pela via nasal.

Seria também interessante comprovar a protecção conferida por esta formulação realizando uma infecção experimental nos animais imunizados. Uma vez comprovada a imunização em ratinhos BALB/c, o próximo passo seria estender o estudo com a formulação lipossomal até aos animais alvo desta doença: os cavalos.

No entanto, antes de se realizarem estes estudos, o revestimento dos lipossomas negativos encapsulando os antigénios seria um caminho alternativo desejável uma vez que os polímeros mucoadesivos podem exhibir níveis de mucoadesão superiores aos provocados pelas interacções electrostáticas. A comparação entre lipossomas positivos e lipossomas revestidos com quitosano (ou outro polímero com capacidade de mucoadesão) na indução da resposta imune poderia ser proveitosa sendo que se poderia comprovar qual das formulações a mais eficaz.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Harrington, D.J., Sutcliffe, I.C. & Chanter, N. The molecular basis of Streptococcus equi infection and disease. *Microbes and Infection* **4**, 501-510(2002).
2. Slater, J.D. Strangles, bastard strangles, vives and glanders: archaeological relics in a genomic age. *Equine veterinary journal* **35**, 118-20(2003).
3. Sweeney, C.R. et al. Streptococcus equi Infections in Horses: Guidelines for Treatment, Control, and Prevention of Strangles. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **19**, 123-134(2005).
4. Waller, A.S. & Jolley, K.A. Getting a grip on strangles: recent progress towards improved diagnostics and vaccines. *The Veterinary Journal* **173**, 492-501(2007).
5. Timoney, J.F. et al. Vaccine potential of novel surface exposed and secreted proteins of Streptococcus equi. *Vaccine* **25**, 5583-90(2007).
6. Laus, F. et al. Clinical and epidemiological investigation of chronic upper respiratory diseases caused by beta-haemolytic Streptococci in horses. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* **30**, 247-60(2007).
7. Timoney, J.F. Equine Strangles : 1999. *AAEP Proceedings* **45**, 31-37(1999).
8. Taylor, S. & Wilson, W.D. Streptococcus equi subsp. equi (Strangles) Infection. *Clinical Techniques in Equine Practice* **5**, 211-217(2006).
9. The British Horse Society *Advice on Strangles. Health (San Francisco)* 13(2008).
10. Lannergård, J. et al. Studies of Fibronectin-Binding Proteins of Streptococcus equi. *Infection and immunity* **73**, 7243-7251(2005).
11. Lindmark, H., Nilsson, M. & Guss, B. Comparison of the Fibronectin-Binding Protein FNE from Streptococcus equi Subspecies equi with FNZ from S . equi Subspecies zooepidemicus Reveals a Major and Conserved Difference. *Infection and immunity* **69**, 3159-3163(2001).
12. Flock, M. et al. Protective effect of vaccination with recombinant proteins from Streptococcus equi subspecies equi in a strangles model in the mouse. *Vaccine* **24**, 4144-51(2006).
13. Flanagan, J. et al. Characterization of the haemolytic activity of Streptococcus equi. *Microbial pathogenesis* **24**, 211-21(1998).
14. Timoney, J.F., Artiushin, S.C. & Boschwitz, J.S. Comparison of the sequences and functions of Streptococcus equi M-like proteins SeM and SzPSe. *Infection and immunity* **65**, 3600-5(1997).

15. Timoney, J.F. et al. Affects of N-terminal variation in the SeM protein of *Streptococcus equi* on antibody and fibrinogen binding. *Vaccine* **28**, 1522-7(2010).
16. Anzai, T. et al. In vivo pathogenicity and resistance to phagocytosis of *Streptococcus equi* strains with different levels of capsule expression. *Veterinary microbiology* **67**, 277-86(1999).
17. Azevedo, A.F. et al. Microencapsulation of *Streptococcus equi* antigens in biodegradable microspheres and preliminary immunisation studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **64**, 131-137(2006).
18. Flock, M. et al. Recombinant *Streptococcus equi* Proteins Protect Mice in Challenge Experiments and Induce Immune Response in Horses. *Infection and immunity* **72**, 3228-3236(2004).
19. Sheoran, A.S. et al. Serum and mucosal antibody isotype responses to M-like protein (SeM) of *Streptococcus equi* in convalescent and vaccinated horses. *Veterinary immunology and immunopathology* **59**, 239-51(1997).
20. Mire-Sluis, A., Das, R. & Lernmark, a Industry news. *Diabetes/metabolism research and reviews* **15**, 80-1(1999).
21. Guss, B. et al. Protective vaccination in the horse against *Streptococcus equi* with recombinant antigens. *Europe* (2009).
22. Reinhold, B. & Venner, M. Original Article. *Equine Veterinary Education* **22**, 40-42(2010).
23. Guss, B. et al. Getting to grips with strangles: an effective multi-component recombinant vaccine for the protection of horses from *Streptococcus equi* infection. *PLoS pathogens* **5**, e1000584(2009).
24. Florindo, H.F. et al. New approach on the development of a mucosal vaccine against strangles: Systemic and mucosal immune responses in a mouse model. **27**, 1230-1241(2009).
25. Florindo, H.F. et al. The enhancement of the immune response against *S. equi* antigens through the intranasal administration of poly- 3 -caprolactone-based nanoparticles. *In Vitro* **30**, 879-891(2009).
26. Wilson-Welder, Jennifer H. Narasimhan, B. Vaccine Adjuvants: Current Challenges and Future Approaches. *Journal of pharmaceutical sciences* **98**, 1278-1316(2009).
27. Nordly, P. et al. Pernille Nordly , Henriette Baun Madsen , Hanne Moerck Nielsen & Camilla Foged †. *Review Literature And Arts Of The Americas* 657-672(2009).

28. Ahsan, F. et al. Targeting to macrophages: role of physicochemical properties of particulate carriers--liposomes and microspheres--on the phagocytosis by macrophages. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **79**, 29-40(2002).
29. Foged, C. et al. Interaction of dendritic cells with antigen-containing liposomes: effect of bilayer composition. *Vaccine* **22**, 1903-13(2004).
30. Pharmaceutical Aspects of Intranasal Delivery of Vaccines Using Particulate Systems. **98**, 812-843(2009).
31. Shahiwala, A., Vyas, T.K. & Amiji, M.M. Nanocarriers for systemic and mucosal vaccine delivery. *Recent patents on drug delivery & formulation* **1**, 1-9(2007).
32. Chadwick, S., Kriegel, C. & Amiji, M. Nanotechnology solutions for mucosal immunization. *Advanced drug delivery reviews* **62**, 394-407(2010).
33. Neutra, M.R. & Kozlowski, P.A. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nature reviews. Immunology* **6**, 148-58(2006).
34. Christensen, D. et al. CAF01 liposomes as a mucosal vaccine adjuvant : In vitro and in vivo investigations. *International Journal of Pharmaceutics* **390**, 19-24(2010).
35. Arca, H.Ç., Günbeyaz, M. & Şenel, S. Chitosan-based systems for the delivery of vaccine antigens. *Expert Reviews* **8**, 937-953(2009).
36. Brgles, M., Habjanec, L. & Halassy, B. Liposome fusogenicity and entrapment efficiency of antigen determine the Th1/Th2 bias of antigen-specific immune response. **27**, 5435-5442(2009).
37. Aguilar, J.C. & Rodríguez, E.G. Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine* **25**, 3752-62(2007).
38. Singh, M. & O'Hagan, D.T. Recent advances in vaccine adjuvants. *Pharmaceutical research* **19**, 715-28(2002).
39. Singh, M. & O'Hagan, D.T. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. *International Journal for Parasitology* **33**, 469-478(2003).
40. Artiushin, S.C. et al. Characterization and immunogenicity of pyrogenic mitogens SePE-H and SePE-I of *Streptococcus equi*. *Microbial pathogenesis* **32**, 71-85(2002).
41. Galan, J.E. & Timoney, J.F. Mucosal Nasopharyngeal Immune Responses of Horses to Protein Antigens of *Streptococcus equi*. *Microbiology* **47**, 623-628(1985).

42. Timoney, J.F. & Trachman, J. Immunologically Reactive Proteins of Streptococcus. *Microbiology* **48**, 29-34(1985).
43. Morein, B. & Lo, K. Functional aspects of iscoms. *Immunology and Cell Biology* 295-299(1998).
44. Waller, A. et al. Vaccination of horses against strangles using recombinant antigens from Streptococcus equi. *Vaccine* **25**, 3629-35(2007).
45. Chanter, N. et al. Recombinant hyaluronate associated protein as a protective immunogen against Streptococcus equi and Streptococcus zooepidemicus challenge in mice. *Microbial Pathogenesis* 133-143(1999).
46. Meehan, M., Nowlan, P. & Owen, P. Affinity purification and characterization of a fibrinogen-binding protein complex which protects mice against lethal challenge with Streptococcus equi subsp. equi. *Microbiology (Reading, England)* **144** (Pt 4, 993-1003(1998).
47. Meehan, M. et al. The fibrinogen-binding protein (FgBP) of Streptococcus equi subsp. equi additionally binds IgG and contributes to virulence in a mouse model. *Microbiology (Reading, England)* **147**, 3311-22(2001).
48. Sheoran, a S., Artiushin, S. & Timoney, J.F. Nasal mucosal immunogenicity for the horse of a SeM peptide of Streptococcus equi genetically coupled to cholera toxin. *Vaccine* **20**, 1653-9(2002).
49. Amin, M., Jaafari, M.R. & Tafaghodi, M. Impact of chitosan coating of anionic liposomes on clearance rate, mucosal and systemic immune responses following nasal administration in rabbits. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **74**, 225-229(2009).
50. Kersten, G.F.A. & Crommelin, D.J.A. Liposomes and ISCOMs. *Proteins* **21**, 915-920(2003).
51. Gregoriadis, G. Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. *Trends in biotechnology* **13**, 527-37(1995).
52. Lasic, D.D. *Handbook of Biological Physics. Science* **1**, 491-519(1995).
53. FENSKE, D.B., CHONN, A. & CULLIS, P.R. Liposomal Nanomedicines: An Emerging Field. *Toxicologic Pathology* **36**, 21-29(2008).
54. Martins, S. et al. Lipid-based colloidal carriers for peptide and protein delivery-liposomes versus lipid nanoparticles. *International journal of nanomedicine* **2**, 595-607(2007).
55. Immordino, M.L., Dosio, F. & Cattel, L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *International journal of nanomedicine* **1**, 297-315(2006).

56. Lasic, D.D. Novel applications of liposomes. *Trends in biotechnology* **16**, 307-21(1998).
57. Lian, T. & Ho, R.J. Trends and developments in liposome drug delivery systems. *Journal of pharmaceutical sciences* **90**, 667-80(2001).
58. Yan, X., Scherphof, G.L. & Kamps, J. a a M. Liposome Opsonization. *Journal of Liposome Research* **15**, 109-139(2005).
59. Miller, C.R. et al. Liposome-cell interactions in vitro: effect of liposome surface charge on the binding and endocytosis of conventional and sterically stabilized liposomes. *Biochemistry* **37**, 12875-83(1998).
60. Thiele, L. et al. Evaluation of particle uptake in human blood monocyte-derived cells in vitro. Does phagocytosis activity of dendritic cells measure up with macrophages? *Journal of Control Release* **76**, 59-. Titus, R.G., Marchand, M., Boon, T., Louis, J.A **7**, 545-555(2001).
61. Thiele, L. et al. Competitive adsorption of serum proteins at microparticles affects phagocytosis by dendritic cells. *Biomaterials* **24**, 1409-18(2003).
62. Schwendener, R.A., Lagocki, P.A. & Rahman, Y.E. The effects of charge and size on the interaction of unilamellar liposomes with macrophages. *Biochimica et biophysica acta* **772**, 93-101(1984).
63. Smith, P.K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* **150**, 76-85(1985).
64. Lowry, O., Randall, R.J. & Lewis, A. Protein Measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* **193**, 265-275(1951).
65. WANG, C. Lowry determination of protein in the presence of Triton X-100. *Analytical Biochemistry* **63**, 414-417(1975).
66. Rouser, G. & Yamamoto, A. Two Dimensional Thin Layer Chromatographic Separation of Polar Lipids and Determination of Phospholipids by Phosphorus Analysis of Spots Values Obtained in Quadruplicate Determinations of Different Amounts of Phosphorus. *Lipids* **5**, 494-496(1969).
67. Muzzarelli, R. a Colorimetric determination of chitosan. *Analytical biochemistry* **260**, 255-7(1998).
68. Blum, H., Beier, H. & Gross, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99(1987).
69. Chiou, C.-jang et al. Mucoadhesive liposomes for intranasal immunization with an avian in uenza virus vaccine in chickens. *Biomaterials* **30**, 5862-5868(2009).

70. Michalek, S.M. Adjuvant Activity of Monophosphoryl Lipid A for Nasal and Oral Immunization with Soluble or Liposome-Associated Antigen. *Society* **68**, 5509-5516(2000).
71. Gregoriadis, G. et al. controlled release. *Journal of Controlled Release* **41**, 49-56(1996).
72. HeaLene Jorgensen, Grith Krøyer Wood, D.C. & , Ida Rosenkrands, C.P. Please scroll down for article. *Journal of Liposome Research* **19**, 99-104(2009).
73. Euge, M. et al. Superoxide dismutase entrapped in long-circulating liposomes: formulation design and therapeutic activity in rat adjuvant arthritis '. *Film* **1564**, 227 - 236(2002).
74. Vyas, S.P. et al. Pegylated protein encapsulated multivesicular liposomes: a novel approach for sustained release of interferon alpha. *Drug development and industrial pharmacy* **32**, 699-707(2006).
75. Colletier, J.-P. et al. Protein encapsulation in liposomes: efficiency depends on interactions between protein and phospholipid bilayer. *BMC biotechnology* **2**, 9(2002).
76. Madan, J. et al. Effect of ampicillin and chloroquine on humoral immune response elicited by bovine albumin encapsulated in liposomes. *In Vivo* **58**, 479-487(2008).
77. Haidar, Z., Hamdy, R. & Tabrizian, M. Protein release kinetics for core-shell hybrid nanoparticles based on the layer-by-layer assembly of alginate and chitosan on liposomes. *Biomaterials* **29**, 1207-1215(2008).
78. Dhoot, N.O. & Wheatley, M. a Microencapsulated liposomes in controlled drug delivery: strategies to modulate drug release and eliminate the burst effect. *Journal of pharmaceutical sciences* **92**, 679-89(2003).
79. Jaganathan, K.S. & Vyas, S.P. Strong systemic and mucosal immune responses to surface-modified PLGA microspheres containing recombinant hepatitis B antigen administered intranasally. *Vaccine* **24**, 4201-11(2006).
80. Nixon, D.F. et al. Synthetic peptides entrapped in microparticles can elicit cytotoxic T cell activity. *Vaccine* **14**, 1523-30(1996).
81. Huang, Y. & Donovan, M. Large molecule and particulate uptake in the nasal cavity: the effect of size on nasal absorption. *Advanced drug delivery reviews* **29**, 147-155(1998).
82. Chono, S. et al. Uptake characteristics of liposomes by rat alveolar macrophages: influence of particle size and surface mannose modification. *The Journal of pharmacy and pharmacology* **59**, 75-80(2007).

83. Mishra, N. et al. Liposomes as adjuvant for combination vaccines. *Indian Journal of Experimental Biology* **45**, 237-241(2007).
84. Galán, J.E. & Timoney, J.F. Molecular analysis of the M protein of *Streptococcus equi* and cloning and expression of the M protein gene in *Escherichia coli*. *Infection and immunity* **55**, 3181-7(1987).
85. Florindo, H.F. et al. *Streptococcus equi* antigens adsorbed onto surface modified poly- ϵ -caprolactone microspheres induce humoral and cellular specific immune responses. *Vaccine* **26**, 4168-4177(2008).
86. Anderson, M. & Omri, A. The effect of different lipid components on the in vitro stability and release kinetics of liposome formulations. *Drug delivery* **11**, 33-9(2009).
87. Agency, E.M. Note for guidance on stability testing: stability testing of new drug substances and products. (CPMP/ICH/2736/99) **341**, 1-20(2003).
88. Sriamornsak, P., Thongborisute, J. & Takeuchi, H. Liposome-Based Mucoadhesive Formulations for Oral Delivery of Macromolecules. *Drugs* doi:10.1007/978-1-4419-0200-9
89. Khatri, K. et al. Surface modified liposomes for nasal delivery of DNA vaccine. *Vaccine* **26**, 2225-33(2008).
90. Laye, C., D.J., M. & Weiss, J. Formation of Biopolymer-Coated Liposomes by Electrostatic Deposition of Chitosan. *Journal of Food Science* **73**, 7-15(2008).
91. Takeuchi, H. et al. Enteral absorption of insulin in rats from mucoadhesive chitosan-coated liposomes. *Pharmaceutical research* **13**, 896-901(1996).
92. Andrews, G.P., Laverty, T.P. & Jones, D.S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. **71**, 505-518(2009).
93. Takeuchi, H. et al. Novel mucoadhesion tests for polymers and polymer-coated particles to design optimal mucoadhesive drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* **57**, 1583 - 1594(2005).
94. Mady, M.M. et al. Biophysical studies on chitosan-coated liposomes. *European Biophysics Journal* **38**, 1127-1133(2009).
95. Davis, S.S. Nasal vaccines. *Advanced drug delivery reviews* **51**, 21-42(2001).
96. Baca-estrada, M.E. et al. Intranasal immunization with liposome-formulated *Yersinia pestis* vaccine enhances mucosal immune responses. *Pharmacia* **18**, 2203-2211(2000).